



ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: RÍO ALCALDE, MARÍA DEL CARMEN DEL
D.N.I./PASAPORTE: ****1988N

PROGRAMA DE DOCTORADO: D348 DOCTORADO EN QUÍMICA FINA
DEPARTAMENTO DE: QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

En el día de hoy 18/07/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de JOSÉ CRISTÓBAL LÓPEZ PÉREZ // ANA MARÍA GÓMEZ LÓPEZ.

Sobre el siguiente tema: *DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS Y DE SONDAS FLOURESCENTES CONJUGABLES*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL⁷ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 18 de julio de 2017

EL PRESIDENTE

Fdo.: JUAN S. VAQUERO

EL SECRETARIO

Fdo.: J.L. Chiara

EL VOCAL

Fdo.: J. ATIENZA

Con fecha 24 de julio de 2017, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: M^{ca} del Carmen del Río Alcalde

⁷ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de julio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por RÍO ALCALDE, MARÍA DEL CARMEN DEL, el día 18 de julio de 2017, titulada *DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS Y DE SONDAS FLOURESCENTES CONJUGABLES*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 27 julio de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Firmado digitalmente por VELASCO
PEREZ JUAN RAMON - DNI
03087239H
Fecha: 2017.07.30 18:49:37 +02'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: RÍO ALCALDE, MARÍA DEL CARMEN DEL

Secretario del Tribunal: JOSÉ LUIS CHIARA ROMERO.

Directores de Tesis: JOSÉ CRISTÓBAL LÓPEZ PÉREZ // ANA MARÍA GÓMEZ LÓPEZ



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: ☐ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20____



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en Química Fina

DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS Y DE SONDAS FLUORESCENTES CONJUGABLES

Tesis Doctoral presentada por

M^a CARMEN DEL RÍO ALCALDE

Directores:

DRA. ANA MARÍA GÓMEZ LÓPEZ

DR. JOSÉ CRISTÓBAL LÓPEZ PÉREZ

Alcalá de Henares, 2017



Programa de Doctorado en Química Fina

DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS Y DE SONDAS FLUORESCENTES CONJUGABLES

Tesis Doctoral presentada por

M^a CARMEN DEL RÍO ALCALDE

Directores:

DRA. ANA MARÍA GÓMEZ LÓPEZ

DR. JOSÉ CRISTÓBAL LÓPEZ PÉREZ

Alcalá de Henares, 2017

A mis padres y a mi hermana por brindarme vuestro apoyo incondicional e infinito cariño que ha sido fundamental para que este proyecto haya llegado hasta aquí.

La **Dra. Carolina Burgos García**, Profesora Titular y Directora del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA: Que **Dña Maria del Carmen del Rio Alcalde**, ha realizado en el Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQOG-CSIC), bajo la dirección de la **Dra. Ana María Gómez López** y el **Dr. Jose Cristóbal López Pérez**, el trabajo experimental recogido en la presente Memoria y titulado:

“Desarrollo de nuevas estrategias para la síntesis de nucleósidos y sondas fluorescentes”

y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en el programa de Doctorado de Química Fina por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Abril de 2017



Fdo. Carolina Burgos García



Dra. ANA MARÍA GÓMEZ LÓPEZ, Investigador Científico del Instituto de Química Orgánica General de Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQOG-CSIC), y

Dr. JOSÉ CRISTÓBAL LÓPEZ PÉREZ, Profesor de Investigación del Instituto de Química Orgánica General de Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQOG-CSIC),

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada "*Desarrollo de nuevas estrategias para la síntesis de nucleósidos y de sondas fluorescentes conjugables.*" ha sido realizada por la licenciada María del Carmen del Río Alcalde en el Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con nuestra inmediata dirección e informamos favorablemente y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, se firma el presente certificado en Madrid, a veintisiete de abril de dos mil diecisiete.

Fdo. Dra. Ana María Gómez López

Dr. Jose Cristóbal López Pérez

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría manifestar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, Dra. Ana Gómez y Dr. Cristóbal López, por haberme dado la oportunidad de formar parte de vuestro grupo, por la confianza depositada en mí y por todas las muestras de ánimo y cariño que me habéis dado en todo momento. Me siento privilegiada de haberos tenido como jefes.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a Dr. Clara Uriel por tu continua disposición y ayuda, y a Marina R. por cuidar de mí casi como una sobrina. Y con todo mi corazón, a mis compañeros de laboratorio Juan, Fer (parte de ti va aquí, gracias!) y en especial a Silvia, ha sido un placer trabajar con vosotros. A Alberto y Jorge, a pesar que vuestro paso por el laboratorio fue corto fue muy agradable. Me llevo un pedacito muy bonito de cada uno de los del grupo.

Al Club de la tortitas, María A., Patricia, Marta, y en especial a María F. gracias por vuestra amistad, he tenido la suerte de encontrar a personas tan buenas como vosotras. A Marina V. mil gracias por tu valiosa amistad, con mayúsculas, me siento afortunada.

También quisiera dar las gracias a las personas del instituto que siempre habéis tenido una sonrisa y un gesto amable y habéis hecho mi estancia más agradable. En especial a Guille, Jose Luis, Rafael del Villar, Isra, David, Miguel, Seo, Hanna, Mourad. Y sobre todo a Patrick y Andrea por demostrarme que se puede contar con vosotros.

Al personal de los servicios de RMN y Masas, por toda la ayuda y disposición para que todo saliese bien. Especialmente gracias a Elisa por tu gran amabilidad y a Sergio te mereces lo mejor y estás muy cerca.

Y finalmente agradecer a los grupos al grupo del Dr. Fraser-Reid de NPG Research Institute, Carolina del Norte, FEUU, al grupo de Dr. Eduardo Peña-Cabrera de la Universidad de Guanajuato así como al grupo del Dr. Íñigo López-Arbeloa y al Dr. Jorge Bañuelos, de la Universidad del País Vasco por su colaboración.

Gracias a Ana por ser una amiga de verdad y estar siempre ahí. A Inés G. por darme el impulso que necesitaba. Gracias de verdad!

A Isasi por aportarme tu pensamiento cognitivo que muchas veces pierdo y mil gracias por muchos días inesperados!

Me gustaría dedicar este trabajo a las personas que más quiero y que sin ellas este trabajo no hubiese sido posible.

A mi hermana Soraya, es el mejor regalo que me ha hecho la vida, me siento muy orgullosa de tí, no te puedo querer más, muchas gracias por tu cariño incondicional.

A mis padres, M^a Carmen y Jesús, por vuestro apoyo, cariño y por darme siempre lo mejor de vosotros, os admiro y os quiero mucho. Mama gracias infinitas por escucharme. Gracias por quererme tanto y siempre. Todo lo que soy os lo debo a vosotros.

Índice	I
Abreviaturas y acrónimos	IV
Resumen/Abstract	VII

ÍNDICE

PRÓLOGO	3
I. CAPÍTULO 1. DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS	
I.1 Introducción	8
I.1.1 Nucleósidos y Nucleótidos	8
I.1.2 Síntesis de Nucleósidos	12
I.1.2.1 Análisis retrosintético	12
I.1.2.2 Formación de enlaces glicosídicos: O-glicosidación	14
I.1.2.3 Formación de enlaces glicosídicos: N-glicosidación con nucleobases	18
I.1.2.4 Donadores de glicosilo en la síntesis de nucleósidos	23
I.1.2.4.1 Haluros de Glicosilo	23
I.1.2.4.2 Ésteres de Glicosilo	27
I.2 Objetivos	32
I.3 Antecedentes y estado actual del tema objeto de trabajo	34
I.3.1 Glicósidos de <i>n</i> -pentenilo (NPG's) en reacciones de O-glicosidación	34
I.3.2 1,2-Ortoésteres como dadores de glicosilo	37
I.4 Resultados y discusión	41
I.4.1 Síntesis de los dadores de glicosilo: 1,2-Ortoésteres de furanosa	42
I.4.2 Síntesis de aceptores de glicosilo: bases nitrogenadas sililadas (púricas y pirimidínicas)	45
I.4.3 Ensayo de <i>N</i> -glicosidación	47
I.4.4 Estudio de la influencia de los grupos protectores del NPOE en la reacciones de <i>N</i> -glicosidación	56
I.4.5 Aproximación a la síntesis de dinucleótidos basada en la reacción de <i>N</i> -glicosidación de ortoésteres de <i>n</i> -pentenilo	66
I.4.5.1 Reacción de acoplamiento entre un nucleósido y un ortoéster de pentenilo vía fosforamidito	70
I.4.5.2 Reacción de Oxidación	75

I.4.5.3 Reacción de <i>N</i> -glicosidación	76
I.5. Conclusiones	80

II. CAPÍTULO 2. DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE SONDAS FLUORESCENTES CONJUGABLES.

II.1 Introducción general	84
II.1.1 Fluorescencia	84
II.1.2 Colorantes BODIPY	90
II.1.2.1 Generalidades	92
II.1.2.2 Propiedades fotofísicas de los BODIPYs	96
II.1.2.3 Síntesis de Bodipys	97
II.1.2.3.1 BODIPYs simétricos	100
II.1.2.3.2 BODIPYs asimétricos	101
II.2 Objetivos	101
II.3 Desarrollo de métodos eficientes de síntesis de derivados de BODIPYs C-8 aril-sustituídos	102
II.3.1 Antecedentes y estado actual del tema	102
II.3.2 Objetivos	109
II.3.3 Resultados y Discusión	109
II.2.3.1 Síntesis de 8-(<i>orto</i> hidroximetil)aryl-BODIPYs	109
II.2.3.2 Propiedades fotofísicas y comportamiento laser de los derivados de 8-C-o-hidroximetilfenil-BODIPYs	121
II.4 Conjugación de BODIPYs mediante reacciones click y Staudinger/Aza-Wittig	125
II.4.1 Antecedentes y estado actual del tema	125
II.4.2 Objetivos específicos	132
II.4.3 Conjugación de BODIPYs a carbohidratos sencillos	132
II.4.3.1 Reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por cobre (CuAAC)	132
II.4.3.2 Síntesis de los pares BODIPY-alquino/carbohidrato-azida y BODIPY-azida/carbohidrato-alquino y estudio de su reacción CuAAC	136
II.4.3.3 Propiedades fotofísicas y láser de los híbridos BODIPY-monosacárido	139
II.4.4 Conjugación de BODIPYs a moléculas portadora de grupo amino	146
II.4.4.1 Funcionalidad azida y reacción de Staudinger en	

el marcaje de biomoléculas	146
II.4.4.2 Objetivos específicos	156
II.4.4.3 Síntesis de azidometilfenil-BODIPYs	157
II.4.4.4 Síntesis y propiedades fotofísicas de bis-BODIPYs simétricos	161
II.4.4.5 Conjugación de azido-BODIPYs con moléculas portadoras de grupos amino	172
II.5. Conclusiones	175
 III. CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL	
III.3.1 Consideraciones generales	179
III.3.1.1 Métodos experimentales	179
III.3.1.2 Propiedades fotofísicas y experimentos láser	180
III.3.1.3 Numeración de los compuestos	181
III.3.2 Síntesis de Nucleósidos	182
III.3.2.1 Síntesis de NPOE	182
III.3.2.2 Preparación de nucleósidos	192
III.3.2.3 Preparación de dímeros	202
III.3.2.4 Preparación de dinucleótido	204
III.3.3 Síntesis de BODIPYs	204
III.3.3.1 Desarrollo de métodos eficientes de síntesis de derivados de BODIPYs C-8 aril-sustituidos	204
III.3.3.2 Conjugación de BODIPYs a carbohidratos sencillos	211
III.3.3.3 Conjugación de BODIPYs a moléculas portadoras de grupos amino.	215
 IV. CAPÍTULO 4. ANEXOS	 228

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AcO Acetato
API-ES Ionización a Presión Atmosférica-Electrospray
Ac Acetilo
AlI Alilo
Ar Arilo
BnO Bencilo
BODIPY Borodipirrometeno
BzO Benzoato
Bn Bencilo
Bu Butilo
dba Dibencilidenacetona
CCF Cromatografía de capa fina
cat. Catalítico
col. Colaboradores
CCF Cromatografía en Capa Fina
c cuádruplete
CuTC Tiofencarboxilato de cobre (I)
d Doblete
DDQ 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DEAD Azodicarboxilato de dietilo
DMF Dimetilformamida
DMAp 4-(Dimetilamino)piridina
DMSO-d⁶ Dimetilsulfóxido deuterado
Equiv. o eq. Equivalentes
ESI+ Ionización por electrospray en modo positivo
Et Etilo
EI Electronic Impacto
FDA Food and Drug Administration
FRET Förster Resonance Energy Transfer
FTIR Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GP Grupo protector
GS Grupo saliente
HSQC Espectroscopía de Correlación de Cuanto-Simple Heteronuclear
Hz Hertzios
HMBC Espectroscopía de Correlación de Múltiples Enlaces Heteronuclear
HRMS Espectrometría de Masas de Alta Resolución
J Constante de acoplamiento
MeO Metoxilo
NIS N-bromosuccinimida
NPG Glicósido de n-pentenilo
NPOE Ortoéster de n-pentenilo
m multiplete
p.f Punto de fusión
Pyr Piridina
Ph Fenilo
q quintuplete
Q-TOF Cuádrupolo-Tiempo de vuelo
PPh₃ Trifenilfosfina
R_f Factor de retención (CCF)
Rto. Rendimiento
RMN Resonancia Magnética Nuclear
s Singlete
t.a. Temperatura ambiente

TBDPS Tert-butildifenilsililo
TBDMS Tert-butildimetilsililo
THF Tetrahidrofurano
t Triplete
TfO Triflato

Desarrollo de nuevas estrategias para la síntesis de nucleósidos y de sondas fluorescentes conjugables

Resumen: En esta Tesis Doctoral se han abordado dos temas de interés en Química y Biología, como son la síntesis de nucleósidos y el diseño de nuevas sondas fluorescentes conjugables basadas en esqueletos de BODIPYs. Dentro del área de la síntesis de nucleósidos hemos desarrollado un nueva aproximación que permite la unión de nucleobases a residuos de ribosa mediante una reacción de *N*-glicosidación en la que se han empleado 1,2-ortoésteres de pentenilo como donadores de glicosilo. Este método permite la síntesis estereoselectiva de nucleósidos, es aplicable tanto a bases púricas como pirimidínicas. Se ha demostrado además la compatibilidad del método con una variedad de grupos protectores en las funciones hidroxilo posibilitando la diferenciación y protección selectiva de los grupos hidroxilo C-2' y C-3'. Se han empleado grupos protectores ortogonales, compatibles con la química de nucleótidos incluyendo grupos fostatotriester. Respecto al diseño de nuevas sondas fluorescentes, hemos desarrollado un nuevo método para la síntesis de derivados de 8-C-aril-BODIPYs con un sustituyente hidroximetilo en posición orto basados en utilización de ftalidas y pirroles como compuestos de partida. El procedimiento, que se puede llevar a cabo como una única operación sintética, es compatible con el empleo de ftalidas de variada naturaleza electrónica y pirroles sustituidos permitiendo el acceso a una amplia colección de BODIPYs. Estos nuevos derivados (8-C-*o*-hidroximetilfenil-BODIPYs) altamente fluorescentes, han sido transformados en 8-C-*o*-azidometil-BODIPYs, que han podido ser conjugados a otras entidades moleculares mediante dos tipos de procesos diferenciados y complementarios. Por un lado la reacción de cicloadición de alquinos y azidas catalizada por cobre ha permitido la preparación de glicosondas por reacción con carbohidratos de variada estereoquímica. Por otro lado la reacción de Staudinger ha posibilitado la ligación de los azidometil BODIPYs con moléculas portadoras de grupos amino.

PRÓLOGO

La síntesis de moléculas orgánicas es una de las partes fundamentales de la química orgánica. La primera síntesis de un compuesto orgánico se llevó a cabo por el químico Friedrich Wöhler en 1828 quien logró transformar cianato de amonio en urea, sustancia obtenida hasta entonces exclusivamente de productos animales. A partir de este acontecimiento, la síntesis de moléculas orgánicas fue uno de los objetivos principales de la química orgánica. En los últimos años, la capacidad de construir moléculas complejas se ha incrementado considerablemente debido al descubrimiento de nuevas reacciones que permiten mejorar otras ya conocidas.

Uno de las principales razones que nos llevan a sintetizar compuestos orgánicos es la elaboración de nuevos análogos de un compuesto natural que presenta alguna propiedad de interés con el objetivo de mejorar esa propiedad. Otra de las razones fundamentales es la preparación a voluntad de nuevas moléculas con propiedades físicas y químicas interesantes.

El objetivo principal en la síntesis de un compuesto es que su ruta tenga un impacto ambiental bajo, observe una economía de átomos, y su coste sea razonable. Por lo tanto implica el diseño de reacciones con el menor número de etapas posible, y dónde la selección de reactivos y disolventes se haga en relación a su precio y su baja toxicidad. Hay que tener también en cuenta que la purificación de los productos de reacción, incluyendo su separación de subproductos de reacción, puede tener un gran impacto en la eficiencia de la síntesis.

En este sentido cobra importancia el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas que permitan la obtención de compuestos de una manera eficiente y barata. Teniendo en cuenta estos aspectos, en la presente Tesis se exponen nuevas rutas sintéticas hacia moléculas orgánicas de interés. Concretamente se aborda el desarrollo de una nueva estrategia de síntesis estereoselectiva de análogos de β -ribonucleósidos para el desarrollo de nuevos fármacos y agentes terapéuticos, y por otro lado se plantea una síntesis alternativa de fluoróforos con características químicas y físicas óptimas para poder ser empleado en el campo de la bioimagen, y que presenten un grupo funcional que posibilite su bioconjugación.

Por tanto, esta Tesis se divide en dos secciones que, aunque diferenciadas, comparten una característica común: el interés del desarrollo de metodologías sintéticas eficaces y económicamente útiles que permitan la síntesis estereoselectiva de β -ribonucleósidos, y de fluoróforos con grupos funcionales adecuados para su bioconjugación.

I. CAPÍTULO 1.

DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS

Este primer capítulo está enmarcado en un proyecto de colaboración entre el grupo del Instituto de Química Orgánica General (IQOG-CSIC) y el grupo de investigación del Profesor Bert Fraser-Reid (NPG Research Institute, Carolina del Norte, EEUU) y dirigido al desarrollo de métodos sintéticos para la obtención de nucleósidos y nucleótidos basados en la utilización de ortoésteres de *n*-pentenilo como donadores de glicosilo en reacciones de *N*-glicosidación. Los resultados obtenidos como consecuencia de esta investigación son los que han originado el primer bloque de trabajo descrito en esta memoria de Tesis doctoral.

I. 1 Introducción

I.1.1 Nucleósidos y Nucleótidos

Los ácidos nucleicos, ADN (Ácido Desoxirribonucleico) y ARN (Ácido Ribonucleico), son compuestos de elevado peso molecular que se encuentran presentes en todas las células y virus. En 1868, el médico alemán Friedrich Miescher,¹ cuando analizaba la composición de núcleos de células procedente de vendajes quirúrgicos, descubrió un cuarto tipo de sustancia esencial de la materia viva y que se sumaba a los ya por entonces conocidos glúcidos, lípidos y proteínas. Se trataba de una sustancia ácida, rica en fósforo, que Miescher denominó “nucleína” y que poco después empezó a conocerse con el nombre de ácido nucleico. Este descubrimiento, que se publicó por primera vez en 1871, no pareció relevante hasta que Albrecht Kossel hizo las primeras investigaciones de su estructura química. Este último, establece las bases de la estructura del ADN, mostrando que las “nucleínas” (nucleoproteínas) consistían en una porción proteica y otra no proteica (ácidos nucleicos).² Durante la década de 1920, el químico Levene analizó los componentes de la molécula de ácido desoxirribonucleico; encontrando que contienen cuatro bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina y timina; el azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato. Levene dedujo correctamente que los nucleótidos eran las unidades estructurales del ADN, y que a su vez estaban formados por una base y fosfato, ambos unidos al azúcar.³ Desafortunadamente, de manera equivocada, concluyó que los cuatro nucleótidos se encontraban en cantidades iguales y postuló la Teoría del Tetra-Nucleótido como unidad básica del ADN, considerándolo una molécula repetitiva, sin capacidad para ser el material genético.

En este contexto histórico, con un conocimiento bastante avanzado de la estructura química de las proteínas y prácticamente desconocido de los ácidos nucleicos, la mayoría de los investigadores consideraban que las proteínas constituían la base química de la herencia. Sin embargo, en 1944, Avery logra la primera evidencia de que el ADN era el portador del material genético.⁴ Entre 1950 y 1953 el bioquímico austriaco Erwin Chargaff y sus colaboradores descubren la equivalencia de bases en el ADN $[A] = [T]$, $[G] = [C]$, $[Purina]/[Pirimidina] = 1$ y que la relación $[A+T]/[G+C]$ es

¹ Miescher, F. *Med. Chem. Unters.*, **1871**, 4, 441-460.

² a) Kossel, A., *Z. Physiol. Chem.*, **1879**, 3, 284–291. b) Dahm, R. *Developmental Biology* **2005**, 278, 274-288

³ a) Levene, P. A.; London, E. S. *J. Biol. Chem.* **1929**, 81, 711-712. b) Levene, P. A.; Mori, T. *J. Biol. Chem.*, **1929**, 83, 803-816. c) Levene, P. A.; Mikeska, L. A.; Mori, T. *J. Biol. Chem.*, **1930**, 85, 785-787.

⁴ Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M.; *J. Exp. Med.*, **1944**, 7, 137-158.

característico de cada especie.⁵ Sus descubrimientos destruyen la teoría del Tetra-Nucleótido y aportan información importante sobre la estructura del ADN, en especial la variación de composición entre especies, que apoya el papel del ADN como material genético, aunque no constituye una evidencia definitiva.

En 1951, Rosalind Elsie Franklin descubre las estructuras helicoidales del ADN conocidas como ADN-A y ADN-B, mediante difracción de rayos X de fibras hidratadas⁶. En 1953, James Watson y Francis Crick,⁷ basándose en los estudios cristalográficos de Rosalind Franklin, descubrieron la estructura de doble hélice de la molécula del ADN. Estos descubrimientos iniciaron el camino para el desarrollo de la biología molecular, caracterizada por la búsqueda del conocimiento biológico en términos de la estructura y función de las moléculas en la célula.

Los ácidos nucleicos son biopolímeros compuestos por unidades de desoxirribosa para el ADN y ribosa para el ARN unidos entre sí por un enlace fosfodiéster 3'-5' formando oligonucleótidos y polinucleótidos. Se puede considerar que los nucleótidos son los sillares estructurales de los ácidos nucleicos, del mismo modo que los aminoácidos lo son de las proteínas o los monosacáridos de los oligosacáridos y polisacáridos. En estos derivados, cada desoxirribosa o ribosa se encuentra unida por la posición C-1 a un grupo amino de una base (púrica o pirimidínica) a través de un enlace β -N-glicosídico. El monosacárido unido a la base se conoce como nucleósido, mientras que el éster fosfato de un nucleósido se llama nucleótido (Figura 1).

⁵ a) Chargaff, E.; Zamenhof, S.; Green, Ch. *Nature*, **1950**, 165, 756-757. b) Chargaff, E.; Lipshitz, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3658-3661.

⁶ Franklin, R.E.; Gosling R.G. *Nature*, **1953**, 171, 740-741.

⁷ Watson, J. D.; Crick, F.H.C. *Nature*, **1953**, 171, 737-738.

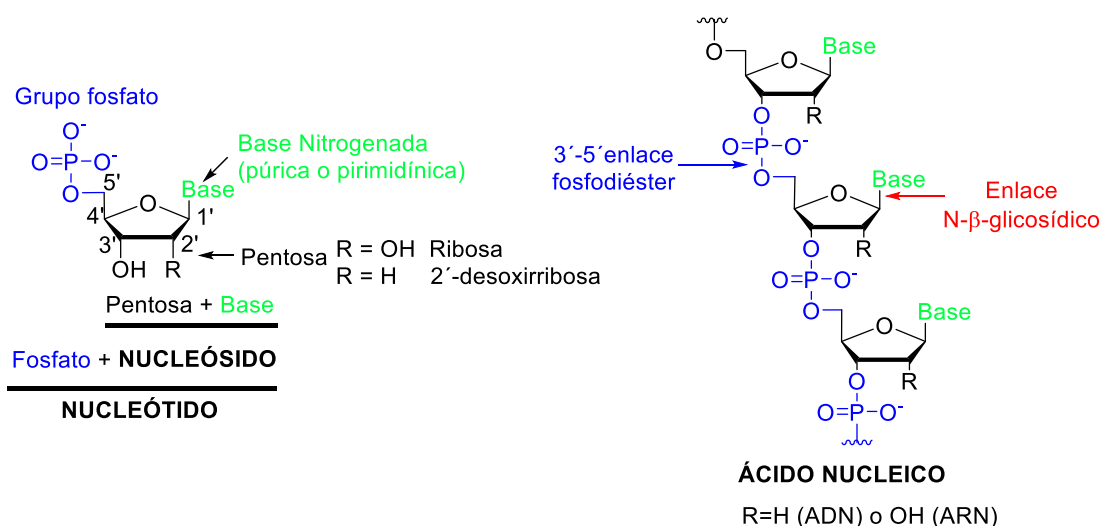


Figura 1. Nucleósido, Nucleótido y Ácido Nucleico

Además de ser los constituyentes de los ácidos nucleicos, los nucleótidos y nucleósidos en sí mismos tienen una importancia biológica notable. Se encuentran libres en la célula, intervienen en la regulación del metabolismo, funcionan como activadores enzimáticos aportando energía química en las reacciones celulares, y actúan como coenzimas e incluso como intermediarios en la síntesis de biomoléculas.⁸

Por ello, pronto se puso de manifiesto que el disponer de análogos sintéticos de nucleósidos y nucleótidos facilitaría el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que podrían ser empleados en el campo de la medicina por sus propiedades antitumorales y antivirales. Esta estrategia, basada en la introducción de pequeñas modificaciones estructurales en los nucleósidos naturales (manteniendo una alta similitud) a fin de que sean capaces de bloquear los procesos enzimáticos en virus o células malignas fue descrita por primera vez en 1959.^{9,10} En dicho trabajo, se llevó a cabo la síntesis del análogo de nucleósido idoxuridina (timidina que reemplaza el metilo de C-5 por un átomo de yodo).¹⁰ Inicialmente, esta molécula fue identificada como un potencial agente antitumoral, pero posteriormente se convirtió en el primer fármaco antiviral empleado clínicamente para el tratamiento tópico del herpes ocular.¹¹ En la actualidad, ocho nucleósidos/nucleótidos están licenciados para el tratamiento de VIH¹² y cinco nucleósidos/nucleótidos han sido aprobados como terapia del virus de la hepatitis B.

⁸ Adams, R. L.P.; Knowler, J. T.; Leader, D. P. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, New York, Springer, **1992**.

⁹ Robins, R. K.; Revankar, G. R. "Antiviral Drug Development", Eds. E. De Clercq, R. T. Walker. Plenum, New York, **1988**, 11.

¹⁰ Prusoff, W. H. *Biochim. Biophys. Acta.* **1959**, 32, 295-296.

¹¹ Kaufman, H. E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, 109, 251-252.

¹² De Clercq, E. *Nature Reviews.* **2007**, 6, 1001-1018.

También se emplean análogos de nucleósidos en el tratamiento del virus del herpes simple, del virus de la varicela, del citomegalovirus, del virus de la gripe y del de la hepatitis C.¹³ Varios análogos de nucleósidos también han demostrado su aplicación clínica en la quimioterapia del cáncer.¹⁴ A modo de ejemplo se cita la arabinosiladenosina (ara-A), arabinosilcitosina (ara-C),¹⁵ 5-fluoro-2'-desoxiuridina (5-FUDR) y 8-azainosina como agentes anticancerígenos, el análogo de la timidina, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT, Zibovudine R) empleado en la terapia contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana como agente causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En los últimos años se han desarrollado 15 nuevos fármacos anticancerígenos aprobados por FDA (Food and Drug Administration, EEUU) de los cuales tres son análogos de nucleósidos: clofarabina,¹⁶ nelarabina¹⁷ y decitabina¹⁸ (Figura 2). Estos hechos ponen de manifiesto la importancia biológica de los nucleósidos y explican el interés existente en la comunidad científica por el desarrollo de métodos sencillos y eficientes que permitan obtener nucleósidos y análogos con propiedades terapéuticas mejoradas.

¹³ De Clercq, E. *J. Clin. Virol.*, **2004**, 30, 115-133.

¹⁴ Galmarini, C. M.; Mackey, J.; Dumontet, C. *Lancet. Oncol.*, **2002**, 3, 415-424.

¹⁵ Chabner, B. A. *Cytidine Analogues in Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*, 2^o ed. Chabner, B.A.; Longo, D.L.; Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia **1995**.

¹⁶ a) Faderl, S.; Gandhi, V.; Keating, M. J.; Jeha, S.; Plunkett, W.; Kantarjian, H. *Cancer*, **2005**, 103, 1985-1995. b) Pui, C. H.; Jeha, S.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2005**, 4, 369-370.

¹⁷ Gandhi, V.; Keating, M. J.; Bate, G.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5, 17-18.

¹⁸ Gore, S. D.; Jones, C.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5, 891-892.

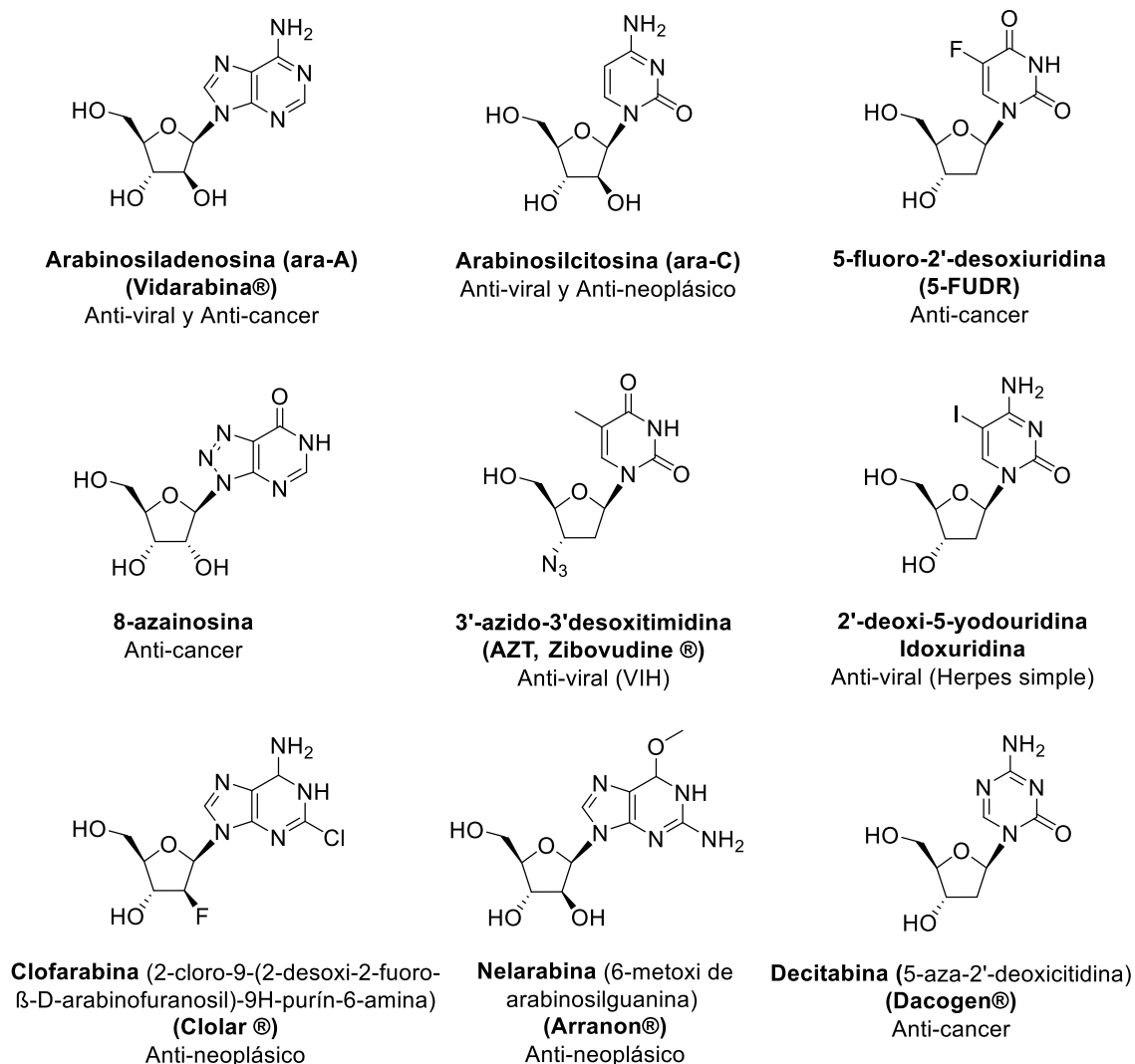


Figura 2. Análogos de nucleósidos empleados como agentes terapéuticos.

I.1.2 Síntesis de Nucleósidos

I.1.2.1 Análisis retrosintético

Desde un punto de vista estructural los nucleósidos presentan un enlace *N*-glicosídico de configuración β entre el carbono C-1' de la pentosa, (ribofuranosa para nucleósidos de ARN y 2-desoxirribofuranosa para nucleósidos de ADN) (por convención, a los átomos de carbono de las pentosas de los nucleótidos se les añade el signo (') para distinguirlos de los átomos numerados de la nucleobase) y uno de los átomos de nitrógeno de la base nitrogenada. La unión tiene lugar por el nitrógeno N-9 en las bases púricas como Adenina (A) y la Guanina (G) y por el nitrógeno N-1 con las bases pirimidínicas: Citosina (C), Timina (T) y Uracilo (U). Las bases A, T, G y C se

encuentran en el ADN, mientras que en el ARN en lugar de Timina aparece Uracilo. (Figura 3).

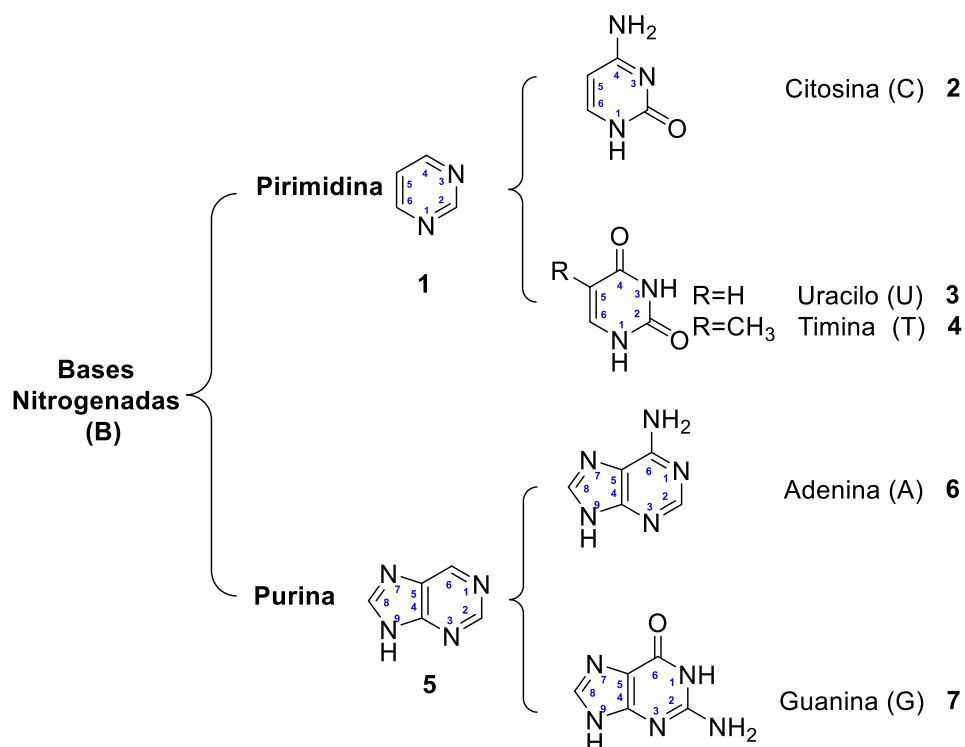


Figura 3. Bases nitrogenadas pirimídicas y púricas.

Considerando estas características estructurales, desde un punto de vista sintético tres son las desconexiones más habituales consideradas en la síntesis de nucleósidos (Figura 4): i) la más ampliamente extendida, convergente, conlleva la formación del enlace *N*-glicosídico entre un derivado de un carbohidrato que actúa como electrófilo y una base nitrogenada que actúa como nucleófilo (desconexión A, Figura 4), ii) alternatively, la unión entre los dos componentes se puede realizar con la combinación opuesta a la anterior y, que implica la reacción de un carbohidrato con un grupo amino en C-1' que actúa como nucleófilo, con una base nitrogenada que contiene una función electrófila (desconexión B, Figura 4), y iii) la última desarrollada para nucleósidos púricos que consiste en la construcción final del esqueleto de la base nitrogenada una vez que el carbohidrato ya ha sido instalado (desconexión C, Figura 4).

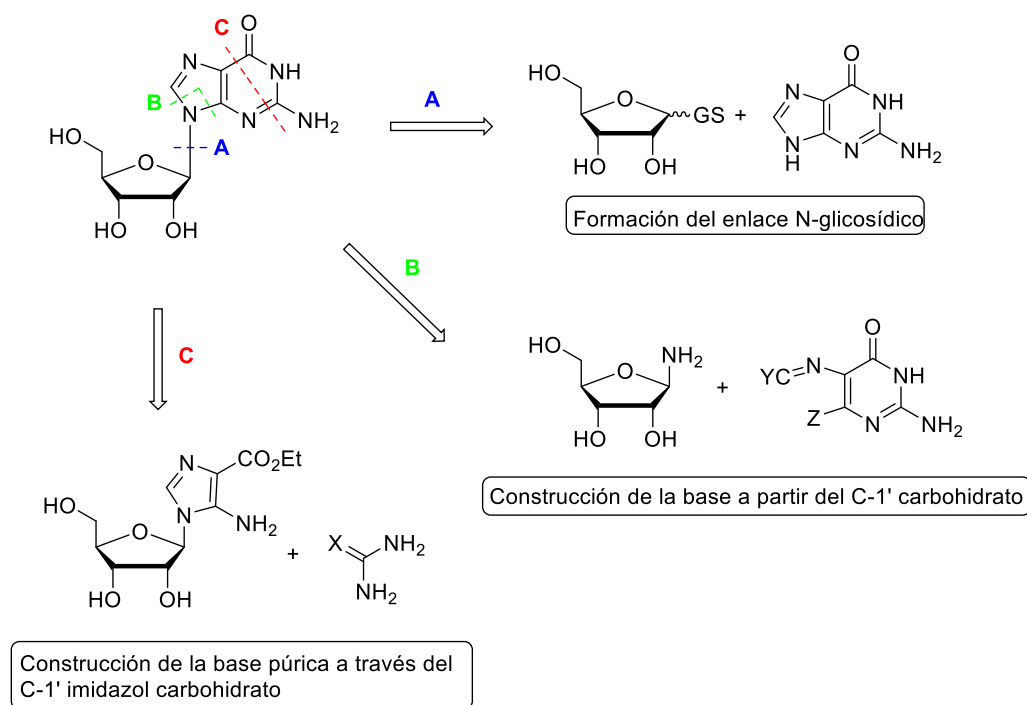


Figura 4. Análisis retrosintético de la síntesis de nucleósidos.

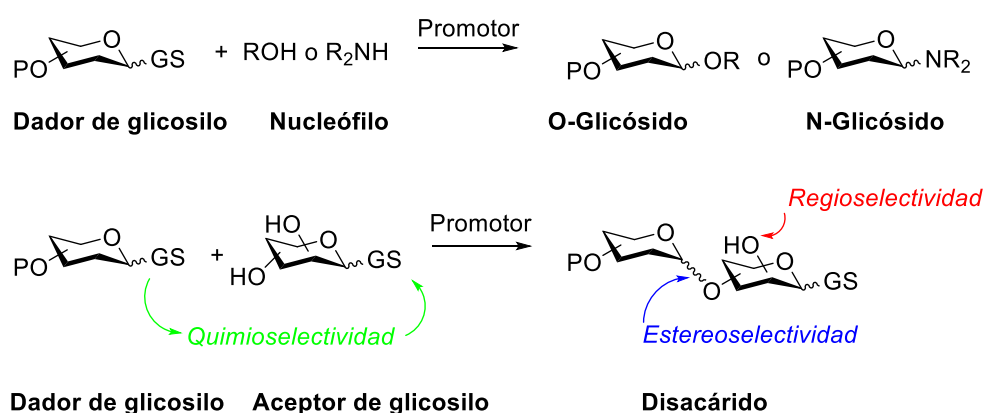
Dado que la primera estrategia (A, Figura 4) es la más extensamente empleada y la que tiene una relación directa con el trabajo presentado en esta Memoria, pasaremos a discutir brevemente las peculiaridades de esta aproximación.

I.1.2.2 Formación de enlaces glicosídicos: O-glicosidación

En realidad, el enlace *N*-glicosídico de los nucleósidos puede ser visualizado como una variante del tipo más habitual de enlace glicosídico, el enlace *O*-glicosídico. De forma genérica, la reacción de formación de enlaces glicosídicos, denominada reacción de glicosidación,¹⁹ consiste en el desplazamiento nucleófilo de un grupo saliente (GS) unido al carbono anomérico de un residuo de azúcar por un nucleófilo como alcoholes, tioles o aminas. El compuesto que aporta el resto de glicosilo se denomina *dador* o *donador* de glicosilo, mientras que el que contribuye con la funcionalidad alcohol (tiol o amina) se conoce como *aceptor* de glicosilo. La reacción de glicosidación generalmente se lleva a cabo en presencia de un activador o promotor

¹⁹ a) Sinaï, P. *Pure & Appl. Chem.*, **1991**, 63, 519-528. b) Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1986**, 25, 212-235. c) Toshima, K.; Tatsuta, K. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1503-1531. d) Boons, G. J. *Contemp. Org. Synth.* **1996**, 3, 173-200. e) Whitfield, D. M.; Douglas, S. P. *Glycoconjugate J.*, **1996**, 13, 5-17. f) Seeberger, P. H.; Bilodeau, M. T.; Danishefsky, S. J. *Aldrichimica Acta*, **1997**, 30, 75-92. g) Davis, B. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2000**, 2137-2160. h) Jung, K. H.; Müller, M.; Schmidt, R. R. *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4423-4442. i) Seeberger, P. H.; Haase, W.-C. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4349-4393. j) Hanessian, S.; Lou, B. *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4443-4463. k) Boons, G. J.; Demchenko, A. V. *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4539-4565.

cuya finalidad es facilitar la salida del grupo saliente en posición anomérica del donador. Los promotores se pueden emplear en cantidades estequiométricas²⁰ o catalíticas, dependiendo del grupo saliente a activar.²¹ Este proceso no es sólo efectivo para el acoplamiento con nucleófilos sencillos sino también con oligosacáridos complejos, péptidos y/o lípidos. El rendimiento y la selectividad de la reacción de glicosidación dependen de la reactividad relativa del donador y el aceptor, así como de los grupos protectores presentes en las dos unidades (dador y aceptor) a combinar. Por otro lado, la naturaleza de los promotores, el disolvente, la concentración y la temperatura también juegan un papel importante en la estereoselectividad de la glicosidación ya que afectan a los intermedios de reacción.²²



Esquema 1. Reacción de glicosidación y selectividad.

Como puede verse en el Esquema 1, la reacción de O-glicosidación para la síntesis de disacáridos, presenta hasta tres de los cuatro modos de selectividad existentes en química orgánica: estéreselectividad, quimioselectividad y regioselectividad.²³ El cuarto tipo de selectividad, la enantioselectividad, no suele considerarse en la síntesis de oligosacáridos, debido a la quiralidad natural intrínseca tanto del dador como del aceptor de glicosilo.

La quimioselectividad se presenta cuando dos o más dadores de glicosilo están expuestos al mismo proceso de activación, pero sólo se pretende activar uno de ellos. Respecto a la regioselectividad, la presencia en las unidades de glicosilo de múltiples

²⁰ Ver por ejemplo: a) Konradsson, P.; Mootoo, D. R.; McDevitt, R. E.; Fraser-Reid, B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 270-272. b) Aloui, M.; Fairbanks, A. J. *Synlett*, **2001**, 797-799. c) Fukase, K.; Hasuoka, A.; Kinoshita, I.; Kusumoto, S. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 7165-7168.

²¹ a) Inanaga, J.; Yokoyama, Y.; Hanamoto T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 13, 1090-1091.

²² Boons, G.J. *Contemp. Org. Synth.*, **1996**, 3, 173-200.

²³ Trost, B.M. *Science*, **1983**, 219, 245-250.

grupos hidroxilo de reactividad similar²⁴ hace necesario el empleo de grupos protectores,^{25,26,27} temporales o permanentes, que puedan liberarse de forma controlada. Los grupos protectores de las funciones hidroxilo provocan además efectos adicionales en las reactividades y selectividades, tanto del donador como del aceptor de glicosilo.^{28,29}

En relación con la estereoselectividad, hace ya más de 70 años, Frush e Isbell³⁰ descubrieron que la presencia de un grupo participante en el hidroxilo contiguo a la posición anomérica, permite ejercer un estereocontrol en la reacción de glicosidación. Así, y según se muestra en el Esquema 2, la activación de dadores de glicosilo con grupos participantes (como el grupo acilo) en la posición O-2 (A, Esquema 2), favorece mediante la asistencia del par electrónico del oxígeno del grupo en O-2 la posible formación de dos intermedios de reacción alternativos (catión oxocarbenio e ión aciloxonio, siendo el mayoritario el ión aciloxonio). El ataque nucleófilo del aceptor de glicosilo transcurre entonces mayoritariamente sobre el ión aciloxonio conduciendo al glicósido 1,2-trans (A, Esquema 2). Alternativamente, cuando los dadores de glicósilo presentan grupos protectores no participantes como éteres, azidas, etc. en la posición O-2, la activación del grupo saliente da lugar a la formación del ion oxocarbenio que puede experimentar el ataque nucleófilo del aceptor por ambas caras α y β (B, Esquema 2).

Es de destacar que el disolvente tiene igualmente una gran influencia en el resultado global del proceso de glicosidación (por ejemplo en la estereoquímica³¹),

²⁴ a) Haines, A. H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1976**, 33, 11-109. b) Moitessier, N.; Chapleur, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 1731-1735.

²⁵ Oscarson S. *Protecting Group Strategies en The Organic Chemistry of Sugars*. Eds. Levy, D. E., Fügedi, P.; Taylor & Francis group, Boca Raton, FL, **2005**, pp. 53-85.

²⁶ a) Kocienski, P. J. *Protecting Groups*, 3ª Ed. George Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**. b) Robertson J. *Protecting Group Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2000**. c) Greene T. W.; Wuts P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Ed. Wiley, New York, **1999**. d) Hanson J. R., *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Sheffield Academic Press, New York, **1999**.

²⁷ Litjens, R. E. J. N.; van den Bos, L. J.; Codeé, J. D. C.; Overkleeft, H. S. van der Marel, G. A. *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 419-429.

²⁸ Green, L. G., Ley, S. V. en *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 1, p. 427-448; Eds. Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinay, P.; Vol. 1. Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, New York: **2000**. p. 367-406.

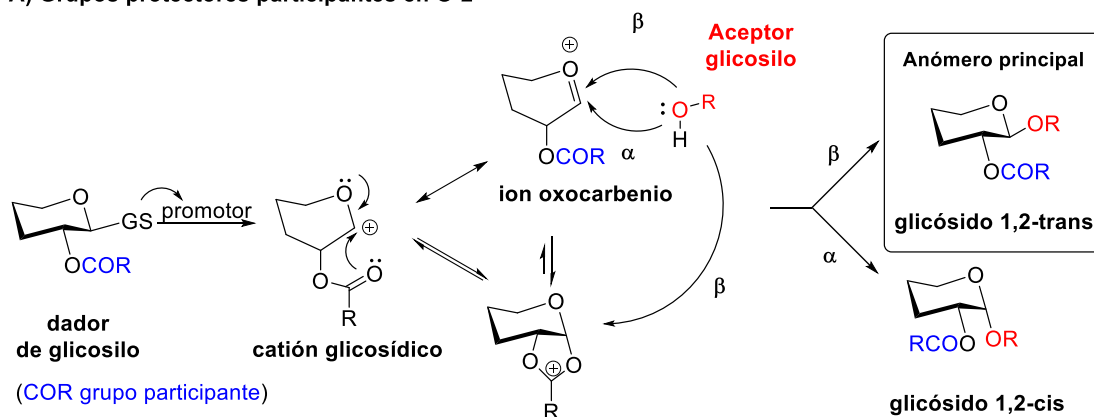
²⁹ Fraser-Reid, B.; Jayaprakash, K. N.; López, J. C.; Gómez, A. M.; Uriel, C. en *Frontiers in Modern Carbohydrate Chemistry ACS Symp. Series*, 390, Ed. Demchenko A. V.; Washington DC, **2007**. pp. 91-117.

³⁰ a) Isbell, H. S. *Ann. Rev. Biochem.*, **1940**, 9, 65-92. b) Frush, H. L.; Isbell, H. S. *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, **1941**, 27, 413-428.

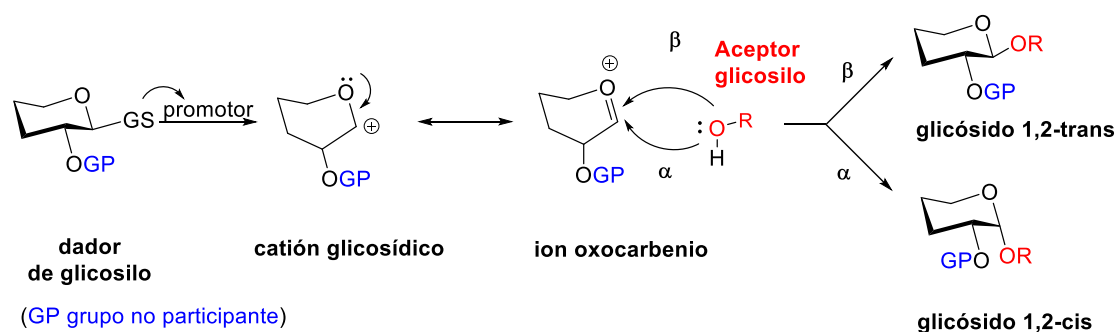
³¹ Paulsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, 21, 155-173.

especialmente en el caso de glicosilos con grupos protectores no participantes.³² Se ha demostrado que tanto el dietil éter o el THF favorecen la formación de 1,2-cis glicósidos, en cambio el acetonitrilo beneficia la formación de glicósidos 1,2-trans cuando no hay grupos no participantes.

A) Grupos protectores participantes en O-2



B) Grupos protectores No participantes en O-2



Esquema 2. Curso de la reacción de O-Glicosidación, A) grupos protectores participantes en O-2, B) grupos protectores no participantes en O-2.

El progresivo conocimiento del mecanismo de reacción, las características y los principios de la reacción de glicosidación, ha estimulado el desarrollo de distintos métodos de glicosidación, con el claro objetivo de encontrar mejores grupos salientes en posición anomérica.³³ En la actualidad existen varios métodos de glicosilación que implican diferentes dadores glicosilo tales como haluros de glicosilo,³⁴ tioglicósidos,³⁵

³² Idelson, M.; Blout, E. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3948–3955.

³³ Toshima, K.; Tatsuta, K. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1503–1531.

³⁴ Shimizu, M.; Togo, H.; Yokoyama, M. *Synthesis*, **1998**, 54, 799–822.

³⁵ a) Ferrier, R.J.; Hay, R.W.; Vethaviasar, N. *Carbohydr. Res.*, **1973**, 27, 55–61. b) Nicolaou, K.C.; Seitz, S.P.; Papahatjis, D.P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 2430–2434. c) Garegg, P.J.; Henrichson, C.; Norberg, T. *Carbohydr. Res.*, **1983**, 116, 162–165.

ortoésteres,^{36,37} tricloroacetimidatos,³⁸ glicósidos de alqueno³⁹ y fluoruros de glicosilo.⁴⁰ Entre otros más recientes, cabría destacar el empleo de yoduros de glicosilo,⁴¹ fosfatos,⁴² glicósidos de telurio,⁴³ carbamatos de sulfonilo,⁴⁴ disulfuros,⁴⁵ así como nuevos derivados de tio-⁴⁶ y O-imidatos⁴⁷.

I.1.2.3 Formación de enlaces glicosídicos: *N*-glicosidación con nucleobases.

En el caso específico de la preparación de nucleósidos, la reacción de *N*-glicosidación implica el acoplamiento entre un derivado de un carbohidrato (habitualmente D-ribosa o D-desoxirribosa adecuadamente funcionalizada), que actuará como dador de glicosilo y una base pirimidínica o púrica que se comportará como aceptor de glicosilo. (Esquema 3). A semejanza con la reacción de *O*-glicosidación, surge la cuestión de la *estereoselectividad* y de la *regioselectividad*.

³⁶ Bochkov, A.F.; Kochetkov, N.K. *Carbohydr. Res.*, **1975**, 39, 355–357.

³⁷ Kochetkov, N.K.; Backinowsky, L.V.; Tsvetkov, Y.E. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 41, 3681–3684.

³⁸ Schmidt, R. R.; Michel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1980**, 19, 731–732.

³⁹ a) Fraser-Reid, B.; Konradsson, P.; Mootoo, D.R.; Udodong, U. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 823–825. b) Marra, A.; Esnault, J.; Veyrieres, A.; Sinaï, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6354–6360 c) Boons, G. J.; Isles, S. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 3593–3596.

⁴⁰ Mukaiyama, T.; Murai, Y.; Shoda, S. *Chem. Lett.*, **1981**, 10, 431–432.

⁴¹ Gervay, J.; Hadd, M. J. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 6961–6967.

⁴² Plante, O. J.; Andrade, R. B.; Seeberger, P. H. *Org. Lett.*, **1999**, 1, 211–214.

⁴³ Stick, R. V.; Tilbrook, D. M. G.; Williams, S. J. *Aust. J. Chem.*, **1997**, 50, 237–240.

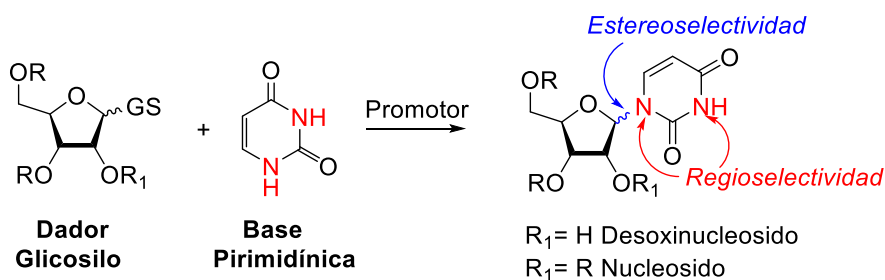
⁴⁴ Hinklin, R. J.; Kiessling, L. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 3379–3380.

⁴⁵ Davis, B. G.; Ward, S. J.; Rendle, P. M. *Chem. Commun.*, **2001**, 189–190.

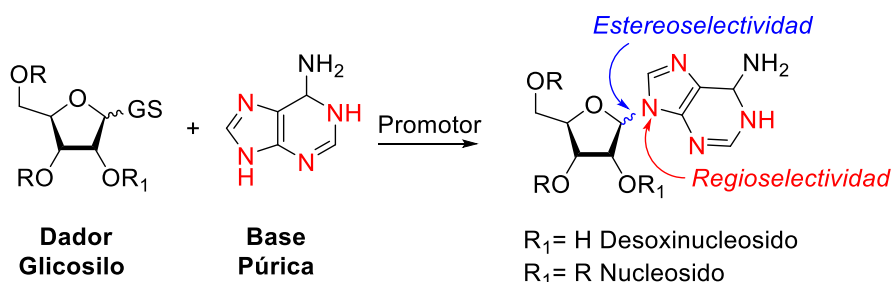
⁴⁶ Demchenko, A. V.; Pornsuriyasak, P.; De Meo, C.; Malysheva, N. N. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 3069–3072.

⁴⁷ a) Adinolfi, M.; Barone, G.; Iadonisi, A.; Schiattarella, M. *Synlett*, **2002**, 2, 269–270. b) Adinolfi, M.; Barone, G.; Iadonisi, A.; Schiattarella, M. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 5573–5577.

a) Reacción N-glicosidación con Base Pirimidínica



b) Reacción N-glicosidación con Base Púrica



Esquema 3. Síntesis de nucleósidos, A) reacción de N-glicosidación con base pirimidínica, B) reacción de N-glicosidación con base púrica.

- *Estereoselectividad*

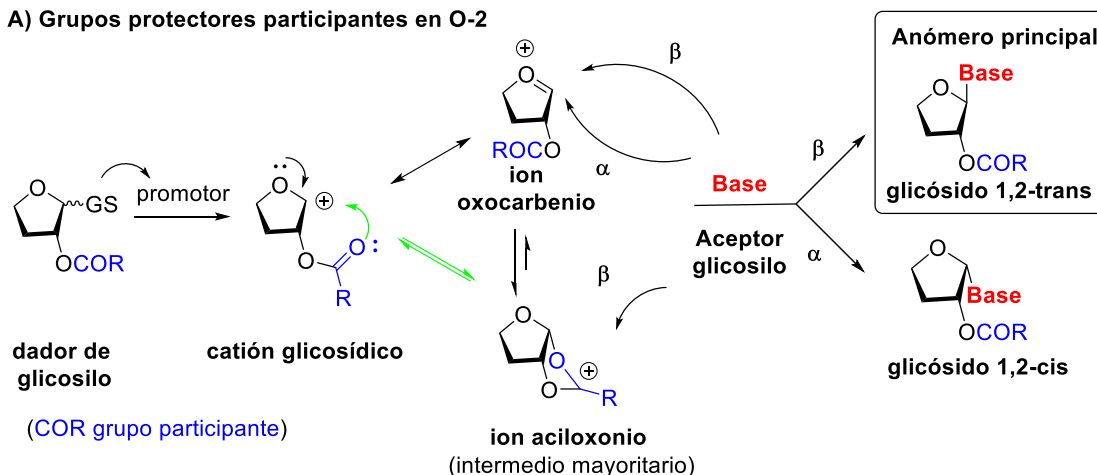
En cuanto a la estereoselectividad se puede obtener una mezcla de dos estereoisómeros anoméricos, el nucleósido 1,2-trans y el nucleósido 1,2-cis. Sin embargo, y tal como ya se ha discutido anteriormente en la reacción de O-glicosidación, la presencia de sustituyentes 2-O-acilo en los dadores de glicosilo permite la obtención mayoritaria de N-glicósidos de tipo 1,2-trans.

La reacción comienza con la activación del grupo saliente dando lugar a la formación del ión oxocarbenio que está en equilibrio con el ión aciloxonio formado gracias a la asistencia del par electrónico del oxígeno del grupo acilo en C-2. La base nitrogenada ataca preferentemente sobre la cara opuesta del ión aciloxonio conduciendo de forma mayoritaria al nucleósido de tipo 1,2-trans. Por lo tanto, mediante esta aproximación se puede obtener el anómero β - en el caso de ribonucleósidos (A, Esquema 4), mientras que se obtendría el anómero α - en el caso de arabinósidos (no mostrado en el Esquema). Al carecer de grupo hidroxilo en C-2, esta estrategia no es aplicable a desoxirribonucleósidos y conduciría a mezclas de ambos anómeros.

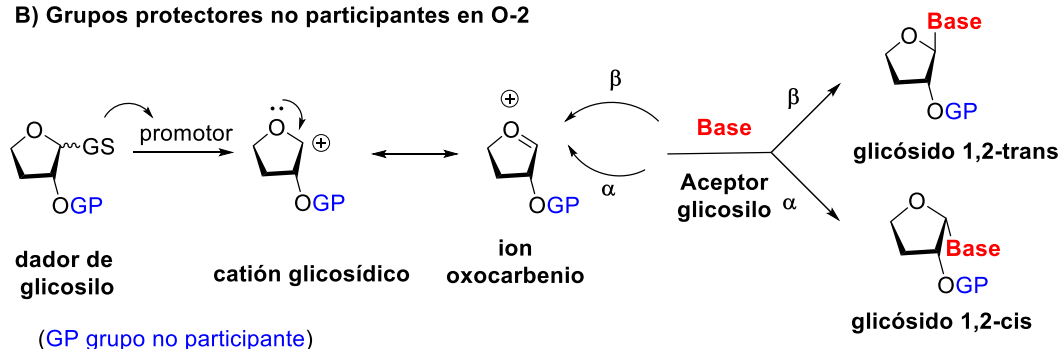
Por otro lado, para la síntesis de nucleósidos 1,2-cis se emplean dadores de glicosilo con grupos no participantes sobre O-2 (B, Esquema 4). En estos casos, no

existe selectividad y el ión oxocarbenio puede experimentar el ataque nucleófilo de la base nitrogenada por la cara α y β .

A) Grupos protectores participantes en O-2



B) Grupos protectores no participantes en O-2



Esquema 4. Mecanismo de glicosidación con A) grupos protectores participantes en O-2, B) grupos no participantes en O-2.⁴⁸

- *Regioselectividad*

En cuanto a la regioselectividad, debido a que la mayoría de las bases heterocíclicas contienen múltiples átomos de nitrógeno nucleófilos, las reacciones raramente son regioespecíficas y normalmente producen mezclas de regioisómeros. Por ejemplo, en reacciones de glicosidación con bases púricas aunque se podrían formar hasta 4 regioisómeros, en general sólo se observa la formación de los nucleósidos en N-9 y en N-7, siendo el primero normalmente el predominante (Figura 5). Por otro lado, la glicosidación de pirimidinas conduce generalmente a mezclas de regioisómeros por

⁴⁸ Demchenko A. V. *General Aspects of the Glycosidic Bond Formation*, Cap. 1 en *Handbook of Chemical Glycosylation*: Ed. Demchenko, A. V.; Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2008**.

reacción en N-1 ó N-3 (Figura 5). La proporción de estas mezclas depende de las condiciones de reacción.⁴⁹

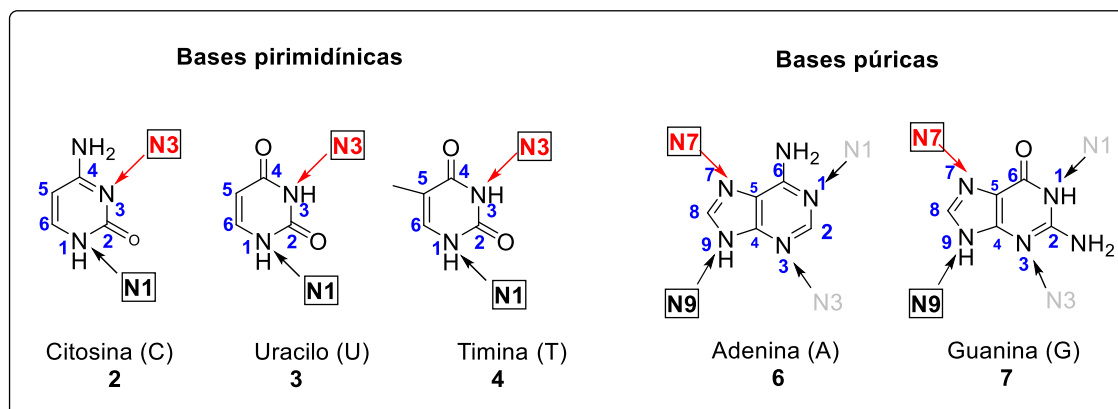
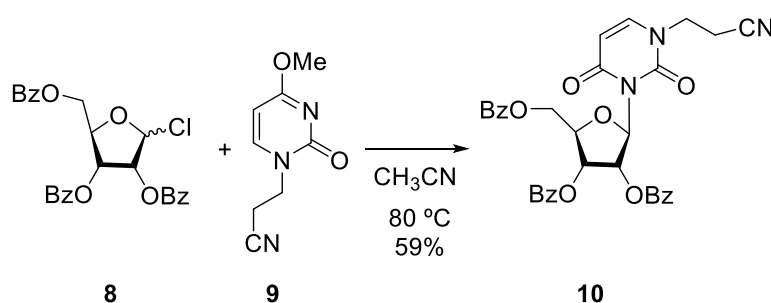


Figura 5. Posiciones reactivas a la *N*-glicosidación de las bases nitrogenadas

El control de la regioselectividad normalmente se logra mediante el empleo de distintos grupos protectores, bien temporales o permanentes, que bloquean aquellos centros que no están directamente implicados en la unión. En el Esquema 5 se muestra un ejemplo de esta estrategia en la que se emplea un derivado de uracilo **9**, en el que se ha bloqueado el nitrógeno más nucleófilo a través de una reacción de alquilación. De esta manera, la glicosidación de **9** con el cloruro de glicosilo benzoilado **8** conduce al N-3-nucleósido **10**, con un rendimiento de 59%. El inconveniente que puede presentar esta estrategia es el bajo rendimiento en las reacciones de glicosidación debido al impedimento estérico de las nucleobases alquiladas⁵⁰.



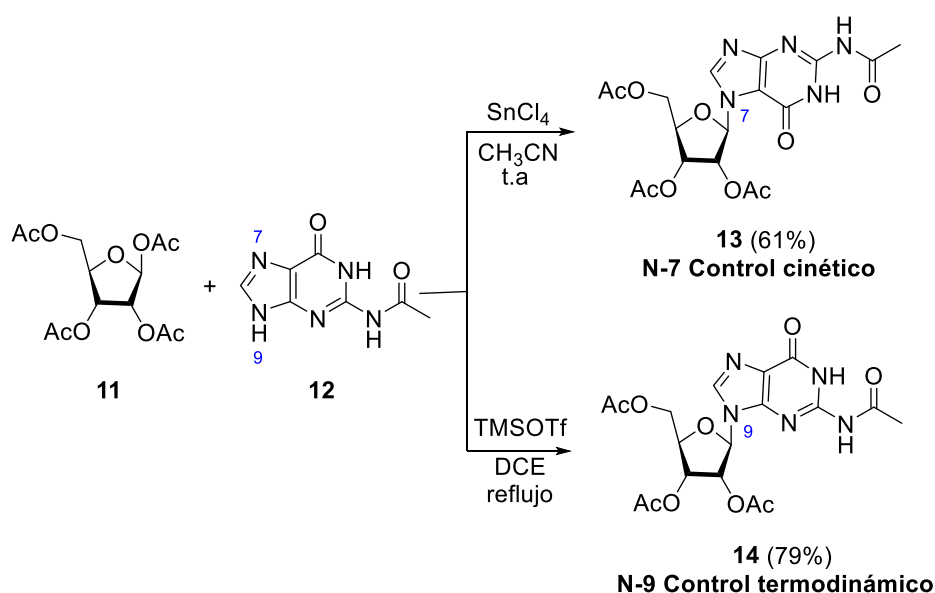
Esquema 5. Reacción de glicosidación regioselectiva utilizando un uracilo alquilado en N-1.

⁴⁹ a) Kjellberg, J.; Johansson, N. G. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, 8, 225-256; b) Geen, G. R.; Kincey, P. M.; Spoors, P. G. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 1781-1784.

⁵⁰ Itoh, T.; Melik-Ohanjanian, R. G.; Ishikawa, I.; Kawahara, N.; Mizuno, Y.; Honma, Y.; Hozumi, M.; Ogura, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37, 3184.

Otra estrategia alternativa para controlar la regioselectividad se basa en explotar las diferentes estabilidades termodinámicas de los productos de reacción. Se ha comprobado que las bases púricas reaccionan cinéticamente en N-7 pero que evolucionan a los nucleósidos en N-9 termodinámicamente más estables (Esquema 6).⁵¹ De esta manera, escogiendo cuidadosamente las condiciones de reacción es posible controlar la regioselectividad de la glicosidación. Por ejemplo, bajo condiciones cinéticas (CH_3CN y temperatura ambiente), el acoplamiento entre 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranosa (**11**) con 2-N-acetilguanina (**12**) origina mayoritariamente el nucleósido unido por N-7 **13** (N-7/N-9, 95:1) (Esquema 6). Sin embargo, cuando la reacción se realiza bajo control termodinámico, con TMSOTf y a reflujo de 1,2-dicloroetano (DCE), se obtiene mayoritariamente el nucleósido que incorpora la base unida por la posición N-9 **14** (N-7/N-9, 1:8) (Esquema 6).⁵²

De forma análoga cuando se usan bases pirimidínicas, el isómero N-3 se forma en condiciones cinéticas, mientras que el isómero N-1 predomina en condiciones termodinámicas.



Esquema 6. Control termodinámico y cinético en la síntesis de Nucleósidos.

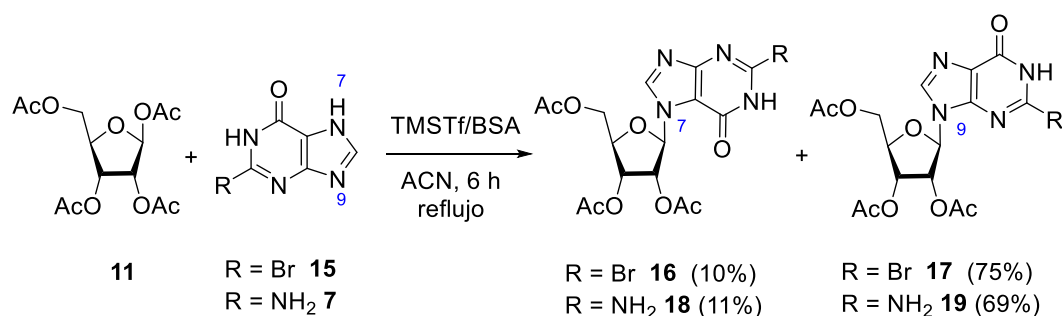
Por otro lado, Dudycz y Wright⁵³ estudiaron las reacciones de glicosidación entre 2-bromohipoxantina **15** y guanina **7** con tetra-O-acetil- β -D-ribofuranosa **11**, en CH_3CN y en presencia de TMSOTf. Concluyeron que inicialmente se forma el producto de control

⁵¹ Miyaki, M.; Shimizu, B. *Chem. Pharm. Bull.*, **1970**, 18, 1446-1456.

⁵² Garner, P.; Ramakanth, S. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 1294-1298.

⁵³ Dudycz, L. W.; Wright, G. E. *Nucleosides Nucleotides*, **1984**, 3, 33-44.

cinético (N-7), pero en condiciones ácidas es posible una transposición al isómero más estable termodinámicamente (N-9). (Esquema 7)



Esquema 7. Regiocontrol en la formación de N-7 y N-9 nucleósidos

I.1.2.4 Donadores de glicosilo en la síntesis de nucleósidos

Como se ha comentado anteriormente, aunque en la actualidad se emplean un buen número de donadores de glicosilo diferentes para las reacciones de O-glicosidación, la oferta de donadores de glicosilo para la formación de N-glicósidos está mucho más limitada.

I.1.2.4.1 Haluros de Glicosilo

Uno de los métodos de formación del enlace glicosídico que revolucionó la síntesis de O-glicósidos, fue el método Koenigs y Knorr, que consiste en el acoplamiento de un haluro de glicosilo con un alcohol, previa activación del primero con un ion de metal pesado, normalmente plata o mercurio. En este sentido, se han desarrollado varios procedimientos de glicosidación adaptados a nucleobases que emplean haluros de glicosilo y que discutiremos a continuación.

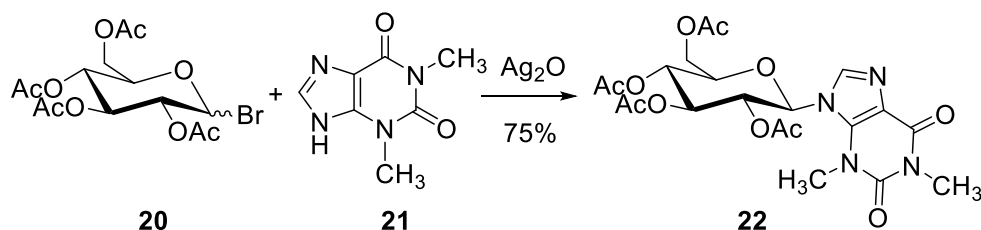
- *Método de Fischer-Helferich. Reacción de haluros de glicosilo con sales de metales pesados de las nucleobases.*

Este método fue introducido por Fischer y Helferich⁵⁴ y Koenigs y Knorr⁵⁵ y se basa en el uso de sales de metales pesados [Ag (I)] de las bases nitrogenadas para catalizar el desplazamiento nucleófilo de una purina sobre un haluro de glicosilo, normalmente bromuro o cloruro. Este método continúa hoy en día en uso especialmente para la síntesis de derivados de guanosina. En el Esquema 8 se muestra un ejemplo de

⁵⁴ Fischer, E.; Helferich, B. *Chem. Ber.*, **1914**, 47, 210-235.

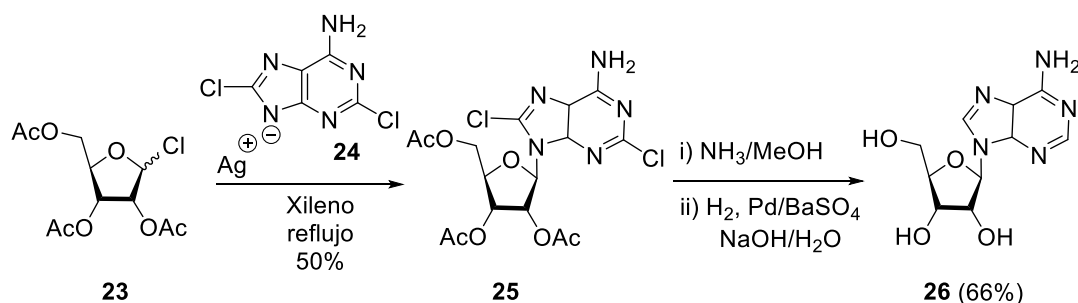
⁵⁵ Koenigs, W.; Knorr, E. *Chem. Ber.*, **1901**, 34, 957-981.

acoplamiento de 1-bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa **20** con teofilina **21** en presencia de óxido de plata (Esquema 8).⁵⁶



Esquema 8. Método de Fischer-Helferich

A. R. Todd, uno de los grandes científicos que contribuyó al desarrollo de la química de nucleósidos y que recibió el premio Nobel de Química en 1957 por su trabajo sobre nucleótidos y coenzimas, adaptó este método a furanosas y bases púricas, logrando sintetizar la adenosina **26** a partir de la sal de plata de la 2,8-dicloroadenina **24** y 1-cloro-2,3,5-tri-O-acetil-D-ribofuranosa **23** (Esquema 9).⁵⁷



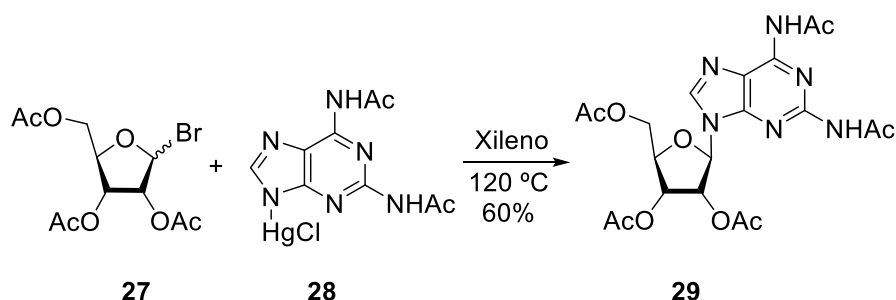
Esquema 9. Síntesis de la Adenosina usando sales de Ag de la nucleobase.

En una modificación posterior, Davoll y Lowy propusieron el uso de sales de Hg (II) de las nucleobases como una herramienta para mejorar los rendimientos.⁵⁸ Como ejemplo de esta estrategia, la sal cloromercurio-6,3-diacetilaminopurina **28** reacciona con el bromuro de 2,3,5-tri-O-acetil-D-ribofuranosa **27**, para originar el correspondiente nucleósido protegido **29** (Esquema 10).

⁵⁶ Fischer, E.; Helferich, B. *Chem. Ber.*, **1914**, 47, 210-235.

⁵⁷ a) Davoll, J.; Lythgoe, B.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.*, **1948**, 967-969; b) Davoll, J.; Lythgoe, B.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.*, **1948**, 1685-1687.

⁵⁸ Davoll, J.; Lowy, B. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 1650-1655.



Esquema 10. Síntesis de un análogo de adenosina usando sales de Hg.

En relación a la estereoselectividad en estas reacciones, se obtiene predominantemente el anómero β. Sin embargo, a pesar de la presencia del grupo 2-O-acilo en el haluro de partida, frecuentemente se suele observar como subproducto de la reacción el correspondiente anómero α.

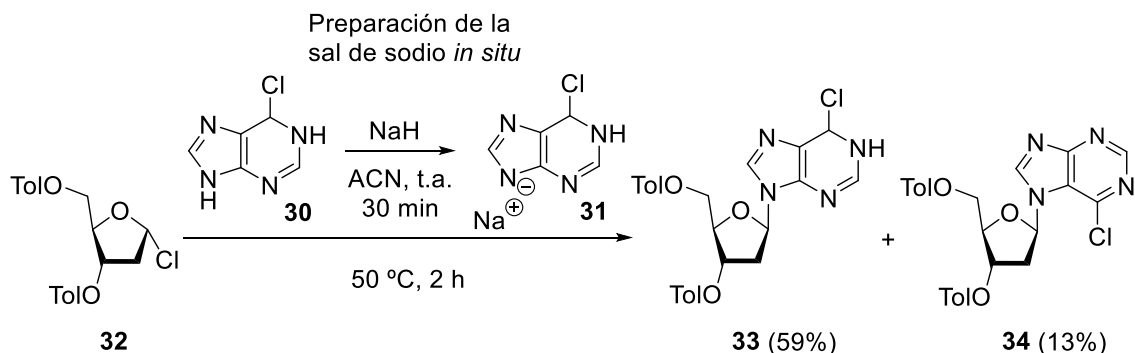
Otras desventajas de estos métodos son la baja solubilidad de las sales de Hg (II) y Ag (I) empleadas en la reacción y la inestabilidad de los haluros de glicosilo de partida. Por último, y como consecuencia de la presencia de trazas de mercurio en los productos finales, se ha observado la asignación errónea de alguna actividad biológica en ciertos nucleósidos preparados por este procedimiento.⁵⁹

- *Reacción de haluros de glicosilo con sales de sodio de las nucleobases*

Para solventar estos inconvenientes y además buscando una alternativa más económica y menos tóxica al uso de los metales pesados, Robins y colaboradores⁶⁰ postularon el uso de sales de sodio de las nucleobases. Esta estrategia implica la desprotonación *in situ* de la base púrica o pirimidínica con NaH y posterior reacción de la sal de sodio resultante con un haluro de glicosilo. La reacción es altamente estereoselectiva ya que transcurre vía S_N^2 del haluro con inversión de Walden en el carbono anomérico, aún así se suele observar una menor regioselectividad que la obtenida con el método de Fischer-Helferich. Así, por ejemplo, en el Esquema 11 se muestra el acoplamiento entre 1-cloro-2-desoxi-3,5-di-O-*p*-tolil-α-D-eritro-pentofuranosa **32** con 6-cloropurina **30** que originó una mezcla de 2,6-dicloro-9-(2-desoxi-3,5-di-O-*p*-tolil-β-D-eritro-pentofuranosil)purina **33** (59%), y el correspondiente isómero N-7 glicosilado **34** (13%). Es de destacar que ambos productos presentan exclusivamente la configuración β en el carbono anomérico a pesar de no existir grupo participante en C-2.

⁵⁹ Sychrovsky, V.; Sebera, J.; Tanaka, Y.; Ono, A. *Inorg. Chim. Acta*, **2016**, 452, 199–204.

⁶⁰ Kazimierzczuk, Z.; Cottam, H. B.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6379–6382.



Esquema 11. Método de las sales de sodio de las nucleobases.

- *Método de Hilbert-Johnson. Reacción de haluros de glicosilo con nucleobases alquiladas*

En 1929, Hilbert y Johnson⁶¹ perciben que las pirimidinas sustituidas son lo suficientemente nucleófilas como para reaccionar directamente con los haluros de glicosilo sin la necesidad de utilizar catalizadores electrófilos para su preactivación. Con esta idea, desarrollaron una metodología que requiere la alquilación de las bases nitrogenadas previamente a su acoplamiento con un haluro de glicosilo.

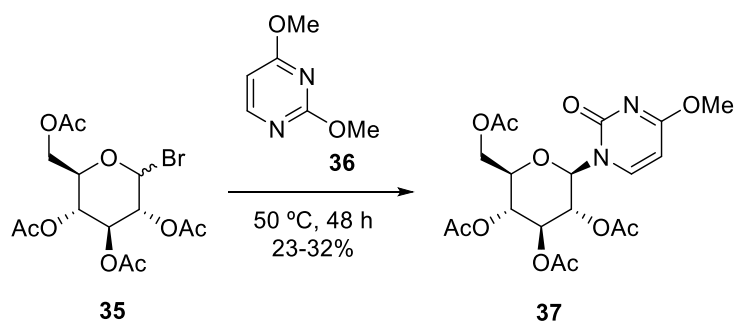
Desde el punto de vista mecanístico, la reacción se inicia con la formación de una sal cuaternaria de amonio (procedimiento de cuaternización) que a elevadas temperaturas elimina el haluro de alquilo para originar el intermedio de condensación buscado. Este método presenta, sin embargo, ciertos inconvenientes: i) en ocasiones el rendimiento se ve mermado por la alquilación de la base con dicho haluro de alquilo y ii) a menudo se observa falta de estéreo selectividad en la glicosidación, obteniéndose frecuentemente mezclas α/β de anómeros.

Un ejemplo clásico, desarrollado por Hilbert y Johnson,⁶² de este procedimiento es la síntesis del glucósido de uracilo **37** a partir de 1-bromo-2,3,4,5-triacetilglucosa (**35**) y la base pirimidínica **3** en forma de 2,4-dimetoxipirimidina **36** (Esquema 12).⁶³

⁶¹ Johnson, T. B.; Hilbert, G. E. *Science*, **1929**, 69, 579-580.

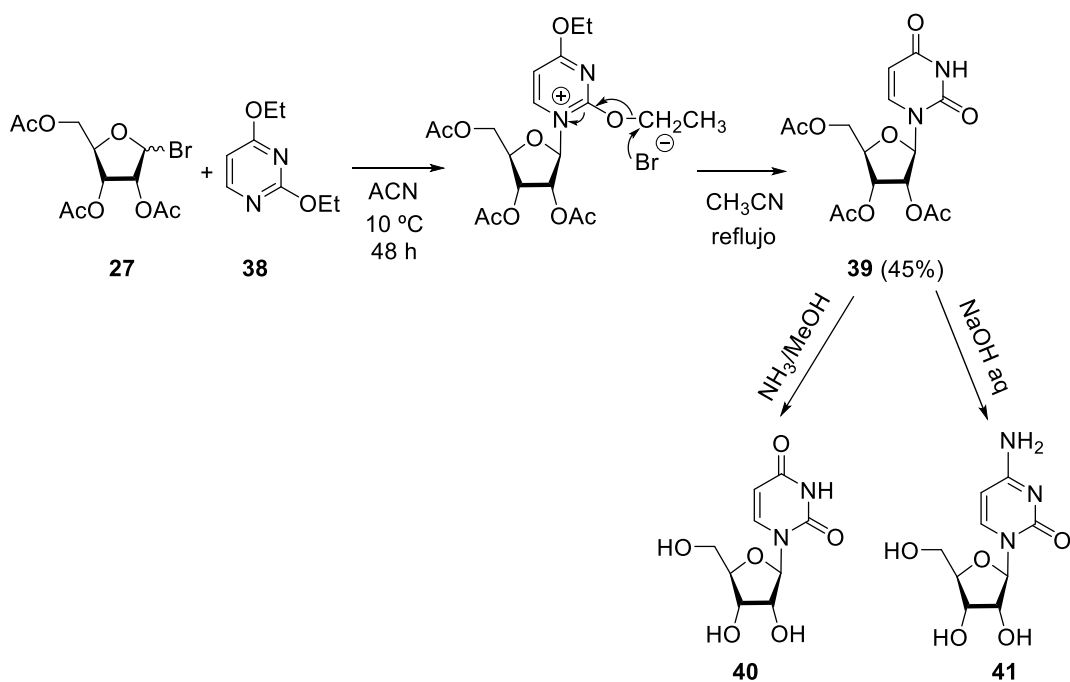
⁶² Hilbert, G. E.; Johnson, T. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1930**, 52, 4489-4494.

⁶³ Hilbert, G. E.; Jansen, E. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 60-62.



Esquema 12. Método de Hilbert-Johnson.

La aplicación de este procedimiento para ribonucleósidos permitió la síntesis de uridina **40** y citidina **41** a partir de 1-bromo-2,3,5-tri-O-acetil-D-ribofuranosa (**27**) y la base pirimidínica **3**, en forma de 2,4-dietoxi-pirimidina **38** (Esquema 13).⁶⁴



Esquema 13. Síntesis de ribonucleósidos utilizando el método de Hilbert-Johnson.

I.1.2.4.2 Ésteres de Glicosilo

A pesar de la indiscutible utilidad de los haluros de glicosilo, las complicaciones derivadas de su inestabilidad y de emplear metales pesados como promotores motivó

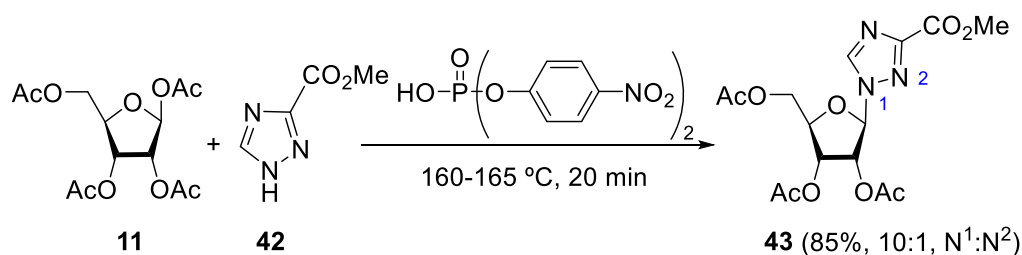
⁶⁴ Howard, G. A.; Lythgoe, B.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.*, **1947**, 1052-1054.

que en 1933, Helferich y colaboradores buscaran otras alternativas como dadores de glicosilo.⁶⁵

En este sentido, se desarrollaron diferentes metodologías utilizando ésteres de glicosilo en la glicosidación con nucleobases. Estos presentan la ventaja de que se activan con relativa facilidad en presencia de un ácido de Lewis y además son más estables que los correspondientes haluros de glicosilo.

- *Método de Síntesis de Fusión. Activación de ésteres de glicosilo con ácidos de Lewis.*

Este método fue introducido en 1960 por Sato y colaboradores,⁶⁶ e implica la calefacción de un azúcar acetilado junto con una base púrica o pirimidínica en presencia de un catalizador ácido, p. ej. TiCl_4 , SnCl_4 , y a presión reducida. Normalmente, se obtienen buenos rendimientos (en torno al 70%), consiguiéndose los mejores resultados cuando se emplean purinas que poseen grupos electroattractores o con bajos puntos de fusión. Sin embargo, la reacción de glicosidación no transcurre con alta estereoselectividad y se suelen generar mezclas anoméricas en los nucleósidos resultantes. Esta estrategia se utilizó, por ejemplo, en la primera síntesis de la Ribavirina,⁶⁷ un análogo de nucleósido, que ha demostrado tener actividad contra una variedad de enfermedades virales,⁶⁸ por reacción de 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranosa (**11**) con 3-carbometoxitriazol **42** (Esquema 14).



Esquema 14. Método de síntesis de fusión

- *Reacción de Vorbrüggen o método de Silil-Hilbert-Johnson*

Una mejora importante en la síntesis de nucleósidos llegó con el empleo de bases sililadas como nucleófilos en las reacciones de glicosidación. Este proceso fue

⁶⁵ Helferich, B.; Schmitz-Hillebrecht, E. *Chem. Ber.*, **1933**, 66B, 378-383.

⁶⁶ Sato, T.; Shimadate, T.; Ishido, Y. *Nippon Kagaku Zasshi.*, **1960**, 81, 1440-1442.

⁶⁷ Witkowski, J. T.; Robins, R. K.; Sidwell, R. W.; Simon, L. N. *J. Med. Chem.*, **1972**, 15, 1150-1154.

⁶⁸ Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Khare, G. P.; Allen, L. B.; Witkowski, J. T.; Robins, R. K. *Science*, **1972**, 177, 705-706.

desarrollado independientemente por los grupos de Nishimura,⁶⁹ Wittenburg⁷⁰ y Birkofer⁷¹ y las ventajas fundamentales son que las bases sililadas son más solubles en los disolventes empleados y más reactivas frente a los derivados de glicosilo. Así, emerge el protocolo de Vorbrüggen para nucleósidos, basado en la condensación de Helferich⁷² y el uso de bases sililadas.⁷³ Esta estrategia surge como alternativa a las dificultades que presentan las reacciones de alquilación de las bases y la inestabilidad de los haluros de glicosilo utilizados en el método Hilbert-Johnson.

La sililación de la base se realiza habitualmente con hexametildisilazano (HMDS) en presencia de una cantidad catalítica de cloruro de trimetilsililo (TMSCl). Alternativamente se puede emplear bis(trimetilsililacetamida) (BSA). Hay que mencionar, sin embargo, que las bases sililadas son susceptibles a la hidrólisis, se aíslan con dificultad y su manejo es delicado.

Por su parte, y de acuerdo con el curso de reacción propuesto para esta reacción, el azúcar peracetilado es activado por la acción de un ácido de Lewis, por ejemplo SnCl₄ o TMSOTf, resultando en la formación *in situ* del cloruro o triflato de glicosilo, respectivamente (Esquema 15). Estos intermedios evolucionan hacia una especie aciloxonio, que finalmente es atrapada por la nucleobase desililada con la consiguiente formación de nucleósido.^{74,75}

⁶⁹ Nishimura, T.; Shimizu, B.; Iwai, I. *Chem. Pharm. Bull.*, **1963**, 11, 1470-1472.

⁷⁰ Wittenburg, E. *Chem. Ber.*, **1968**, 101, 1095-1114.

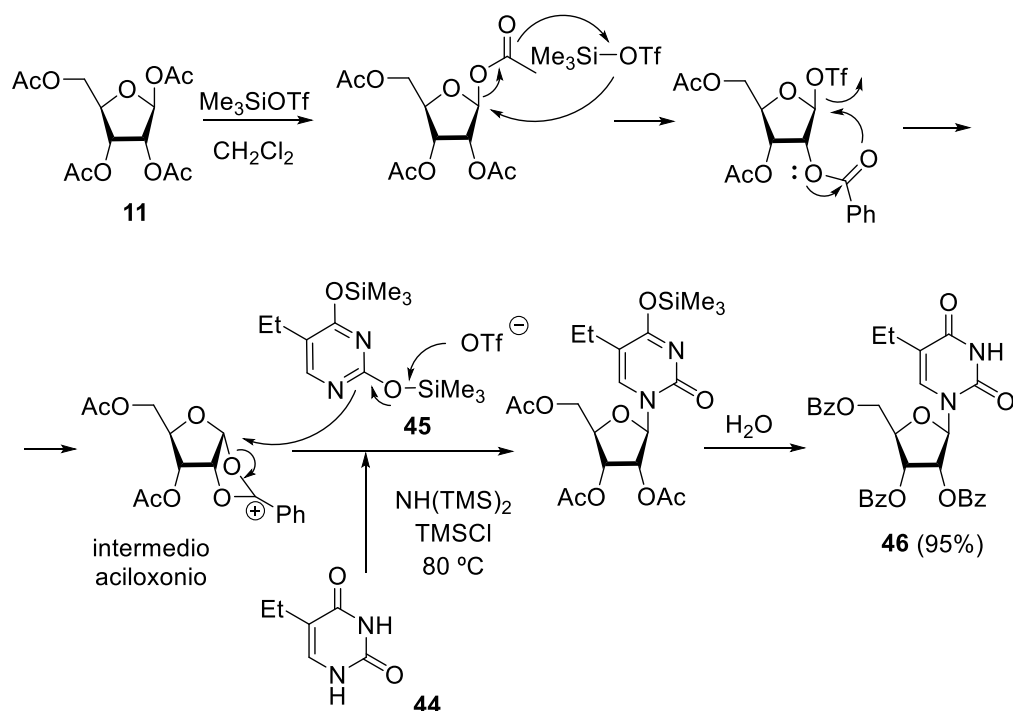
⁷¹ Birkofer, L.; Ritter, A.; Kùlthau, H. P. *Angew. Chem.*, **1963**, 75, 209-210.

⁷² Helferich, B.; Schmitz-Hillebrecht, E. *Chem. Ber.*, **1933**, 66B, 378-383.

⁷³ a) Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1970**, 9, 461-462. (b) Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 3654-3660. (c) Freskos, J. N. *Nucleosides Nucleotides.*, **1989**, 8, 549-555.

⁷⁴ Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1975**, 14, 421-422.

⁷⁵ Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K.; Bennua, B. *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1234-1255.



Esquema 15. Reacción de Vorbrüggen. Metodo Silil-Hilbert-Johnson

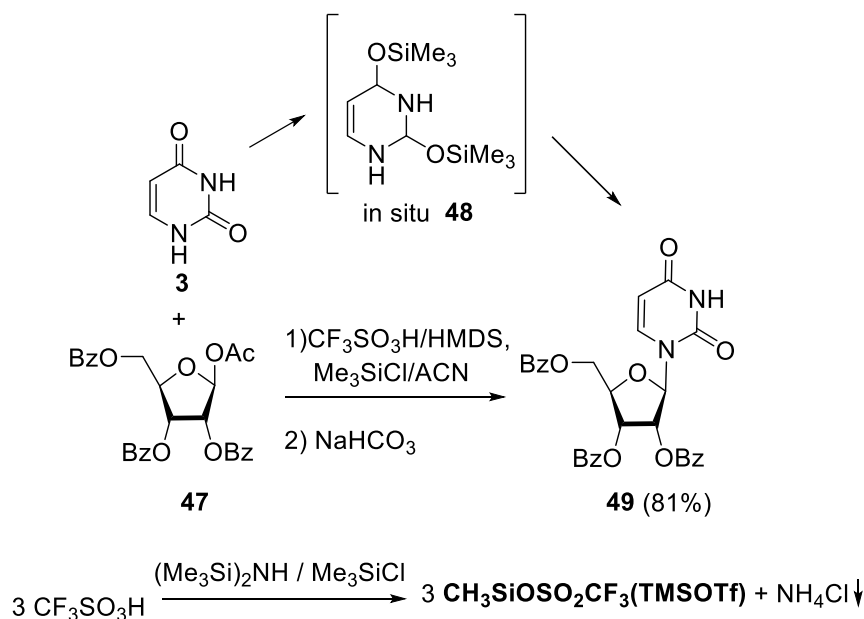
Normalmente, mediante este método se obtienen buenos rendimientos y una alta estereoselectividad en los productos de reacción. La configuración del centro anomérico en el nucleósido resultante viene determinada por la asistencia anquimérica del grupo de tipo acilo sobre O-2.⁷⁶ Sin embargo, en el caso de 2-desoxirribonucleósidos no es posible la participación de los grupos vecinos obteniéndose mezclas de anómeros.

El desarrollo de una variante *one-pot* para la sililación de la base nitrogenada y posterior acoplamiento con el acilglicósido activado supuso un gran avance para la síntesis de nucleósidos.⁷⁷ Por ejemplo, en el Esquema 16 se muestra la combinación de ácido trifluorometanosulfónico (TfOH), cloruro de trimetilsililo (TMSCl), y hexametildisilazida de sodio (NaHMDS), para llevar a cabo tanto la sililación de la nucleobase **3** como su posterior acoplamiento con el azúcar **47**, obteniéndose el nucleósido **49** con un 81% de rendimiento (Esquema 16).⁷⁸

⁷⁶ Frush, H. L.; Isbell, H.S. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1941**, 27, 413-428.

⁷⁷ Vorbrüggen, H.; Bennua, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 1339-1342.

⁷⁸ Vorbrüggen, H.; Bennua, B. *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1279-1286.

Esquema 16. Método *one-pot* de la reacción de Vorbrüggen

Respecto al uso de catalizadores ácidos, inicialmente se empleó HgBr_2 y ácidos de Lewis tales como SnCl_4 o ZnCl_2 , pero estos ácidos además de activar el azúcar pueden formar complejos con los centros básicos de la base, impidiendo su acoplamiento. Por lo tanto, con el tiempo han sido sustituidos por silil ésteres de ácidos fuertes, como triflato de trimetilsililo, nonaflato de trimetilsililo y/o perclorato de trimetilsililo, ya que son lo suficientemente ácidos para activar el azúcar sin coordinar los centros nucleofílicos de la base.

Si bien el protocolo de Vorbrüggen constituye en la actualidad la estrategia más utilizada para la síntesis de nucleósidos, todavía existen algunas limitaciones:

1. En este procedimiento se emplean dadores con grupos protectores tipo éster (poco reactivos o “desarmados”)⁷⁹ junto con aceptores nucleófilos débiles, como son las base sililadas, y por ello se requieren condiciones enérgicas que incluyen altas temperaturas y/o el uso de ácidos de Lewis muy fuertes. Estas condiciones de reacción extremas no permiten emplear derivados de bases o carbohidratos densamente funcionalizados.
2. En esta estrategia, el control de la estereoquímica 1,2-trans está sujeto a la presencia de un grupo participante en C-2 del hidrato de carbono y aun así

⁷⁹ Mootoo, D.R.; Konradsson, P.; Udodong, U.; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5583-5584.

se suelen observar cantidades variables del correspondiente isómero- α no deseado.

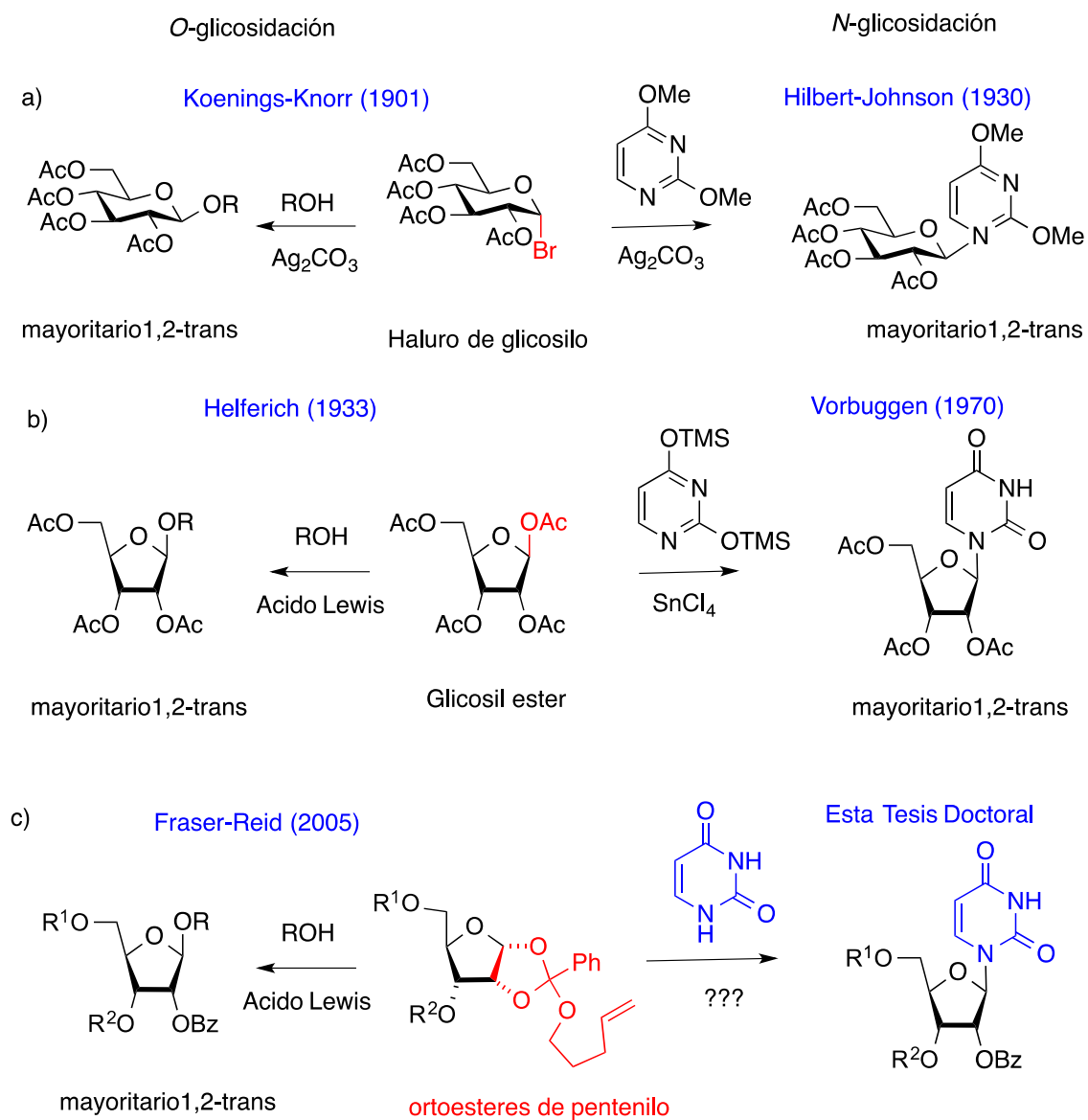
3. Dado que el método emplea derivados de furanosas peraciladas, se hace difícil la diferenciación y protección selectiva de los grupos hidroxilos en C-2' y C-3' del núcleo de ribosa una vez llevada a cabo la glicosidación, ya que la rica funcionalidad de la base puede no tolerar adecuadamente las ulteriores transformaciones del azúcar.

A pesar de los diferentes procedimientos preparativos para los nucleósidos expuestos anteriormente, se puede concluir que todavía existe la necesidad de desarrollar procedimientos eficaces, eficientes y estereoselectivos que solucionen los inconvenientes comentados.

I.2. Objetivos

Teniendo en cuenta estas premisas, y dado que donadores de glicosilo que han sido empleados en reacciones de O-glicosidación han sido posteriormente aplicados a reacciones de N-glicosidación en el contexto de la síntesis de nucleósidos (Esquema 17a,b), nos propusimos como objetivo principal de esta sección de la Tesis explorar la posibilidad del empleo de ortoésteres de *n*-pentenilo, hasta ahora sólo usados en reacciones de O-glicosidación, en reacciones de formación de nucleósidos a través de un proceso de N-glicosidación (Esquema 17c).

La propuesta, que se detallará a continuación, se sustenta en la experiencia previa del grupo de investigación en el uso de ortoésteres de pentenilo en reacciones de O-glicosidación. Desde nuestro punto de vista esta propuesta presenta varias ventajas frente a los métodos disponibles: (i) los ortoésteres de *n*-pentenilo son fácilmente preparables; (ii) son compuestos estables que se pueden almacenar; (iii) la funcionalidad 1,2-ortoéster facilita la diferenciación del hidroxilo en O-2 con los hidroxilos O-3 y O-5, al tiempo que actúa como precursor de un grupo acilo sobre O-2' y activa C-1 en el proceso de glicosidación; (iv) la experiencia previa del grupo en reacciones de O-glicosidación había demostrado que los ortoésteres de *n*-pentenilo, aún siendo compuestos estables, poseen una elevada reactividad lo que debía posibilitar el empleo de condiciones suaves de reacción; (v) las reacciones de acoplamiento de ortoésteres son completamente estereoselectivas.



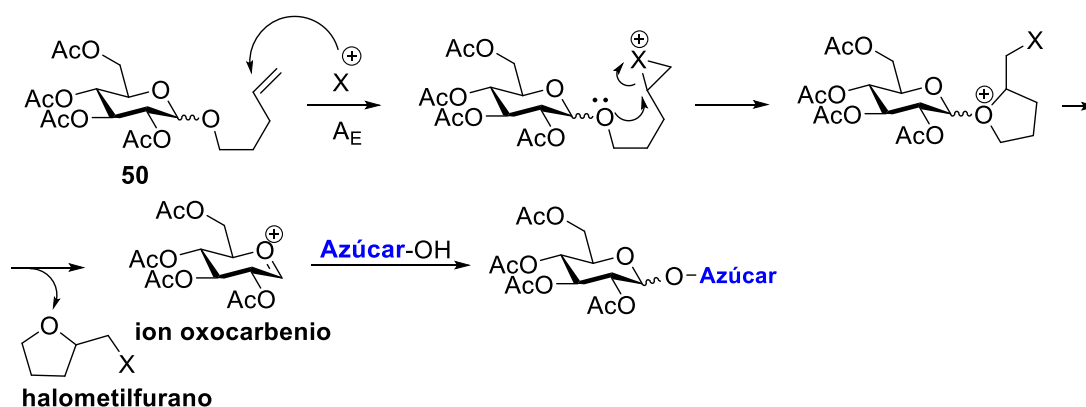
Esquema 17. Dadores de glicosilo para la síntesis de O- y N-glicósidos

I.3 Antecedentes y estado actual del tema.

I.3.1. Glicósidos de *n*-pentenilo (NPG's) en reacciones de O-glicosidación

El grupo *n*-pentenilo, fue propuesto por Fraser-Reid y colaboradores en el año 1988 como un nuevo sustituyente del OH anomérico del azúcar, que permitía su liberación quimioespecífica empleando condiciones no ácidas basadas en el uso de *N*-bromosuccinimida (NBS) en una mezcla de acetonitrilo/agua (CH₃CN-H₂O).⁸⁰ Posteriormente, demostraron que cuando se empleaba un alcohol como nucleófilo en lugar de agua, se formaba en condiciones análogas y de forma exclusiva, el correspondiente O-glicósido. Una de las ventajas de los glicósidos de *n*-pentenilo frente a otros donadores de glicosilo, p. ej. haluros, tricloroacetimidatos, etc., es su gran estabilidad química frente a diferentes condiciones de reacción. Esto les ha permitido establecerse como dadores de glicosilo útiles en la síntesis de biomoléculas de cierta consideración.^{81 82}

La activación del grupo saliente en NPGs, se basa en una adición electrófila del catión halonio sobre el doble enlace del aglicón, lo que desencadena tras de una serie de intermedios catiónicos, la expulsión de un halometilfurano, y la formación del catión oxonio característico de las reacciones de glicosidación. Este es finalmente atacado por el nucleófilo para generar el glicósido correspondiente (Esquema 18).



Esquema 18. Glicosidación con glicósidos de *n*-pentenilo

⁸⁰ a) Mootoo, D. R.; Data, V.; Fraser-Reid, B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1987**, 1462-1464. b) Mootoo, D. R.; Date, V.; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2662-2663. c) Fraser-Reid, B.; Konradsson, P.; Mootoo, D.R.; Udodong, U. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 823-825.

⁸¹ Mootoo, D. R.; Konradsson, P.; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8540-8542.

⁸² Udodong, U. E.; Rao, C. S.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron* **1992**, 48, 4713-4724.

Posteriormente, se encontraron promotores alternativos a la NBS para la activación de glicósidos de *n*-pentenilo, que incluían yodo molecular,⁸³ N-yodosuccinimida (NIS), perclorato de yododicolidinio (IDCP),^{84,85} y triflato de yododicolidinio (IDCT).⁸⁶ Más recientemente se ha descrito el uso de NIS bajo irradiación de microondas como promotor en reacciones de glicósidos de *n*-pentenilo.⁸⁷ También son útiles promotores más activos basados en la combinación de cantidades estequiométricas de NIS con ácidos, bien próticos como el ácido triflico (TfOH)⁸⁸ o de Lewis, tales como triflato de trietilsililo (TESOTf)⁸⁹ o BF₃·Et₂O.⁹⁰

Además al analizar la hidrólisis y glicosidación de glicósidos de *n*-pentenilo diferentemente protegidos, el grupo de Fraser-Reid demostró la importancia de la naturaleza de los grupos protectores en las reactividades del donador de glicosilo en reacciones de glicosidación.^{91,92,93} De esta manera, el grupo de Fraser-Reid introdujo en 1988 el concepto de “armado-desarmado”⁹⁴ (referente a donadores de glicosilo) basado en la influencia de los grupos protectores (éter vs éster) en la reactividad relativa de los donadores de glicosilo y que se estableció como un método para llevar a cabo la activación quimioselectiva de donadores “armados” en presencia de “desarmados” (Esquema 19).

⁸³ Kartha, K. P. R.; Karkkainen, T. S.; Marsh, S. J.; Field, R. A. *Synlett*, **2001**, 260-262.

⁸⁴ Mootoo, D. R.; Konradsson, P.; Udodong, U. E.; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 5583-5584

⁸⁵ Mootoo, D. R.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 2363-2366

⁸⁶ Fraser-Reid, B.; Konradsson, P.; Mootoo, D. R.; Udodong, U. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 823-825

⁸⁷ Mathew, F.; Jayaprakash, K. N.; Fraser-Reid, B.; Mathew, J.; Scicinski, J. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 9051-9054.

⁸⁸ a) Konradsson, P.; Mootoo, D. R.; McDevitt, R. E.; Fraser-Reid, B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 270-272

⁸⁹ Fraser-Reid, B.; Udodong, U. E.; Wu, Z.; Ottosson, H.; Merritt, J. R.; Rao, C. S.; Roberts, C.; Madsen, R. *Synlett*, **1992**, 927-942.

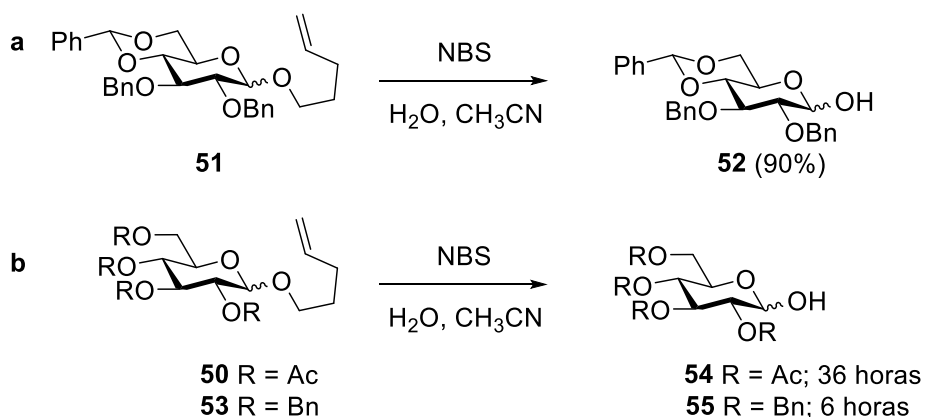
⁹⁰ Fraser-Reid, B.; López, J. C.; Radhakrishnan, K. V.; Mach, M.; Schlueter, U.; Gómez, A. M.; Uriel, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3198-3199.

⁹¹ a) Green, L. G.; Ley, S. V. *Carbohydrates in Chemistry and Biology*. Vol. 1. Eds. B. Ernst, G. W. Hart and P. Sinay, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, pp 427-448, **2000**.

⁹² Paulsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 155-173.

⁹³ Fraser-Reid, B.; Jayaprakash, K. N.; López, J. C.; Gómez, A. M.; Uriel, C. *Frontiers in Modern Carbohydrate Chemistry* (ACS Symposium Series 960). Washington DC: Ed. A. V. Demchenko; **2007**.

⁹⁴ a) Fraser-Reid, B.; Wu, Z.; Udodong, U. E.; Ottosson, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6068-6070; b) Mootoo, D. R.; Konradsson, P.; Udodong, U. E.; Fraser-Reid, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 5583-5584.



Esquema 19. Efecto de los grupos protectores en la hidrólisis oxidativa de NPGs

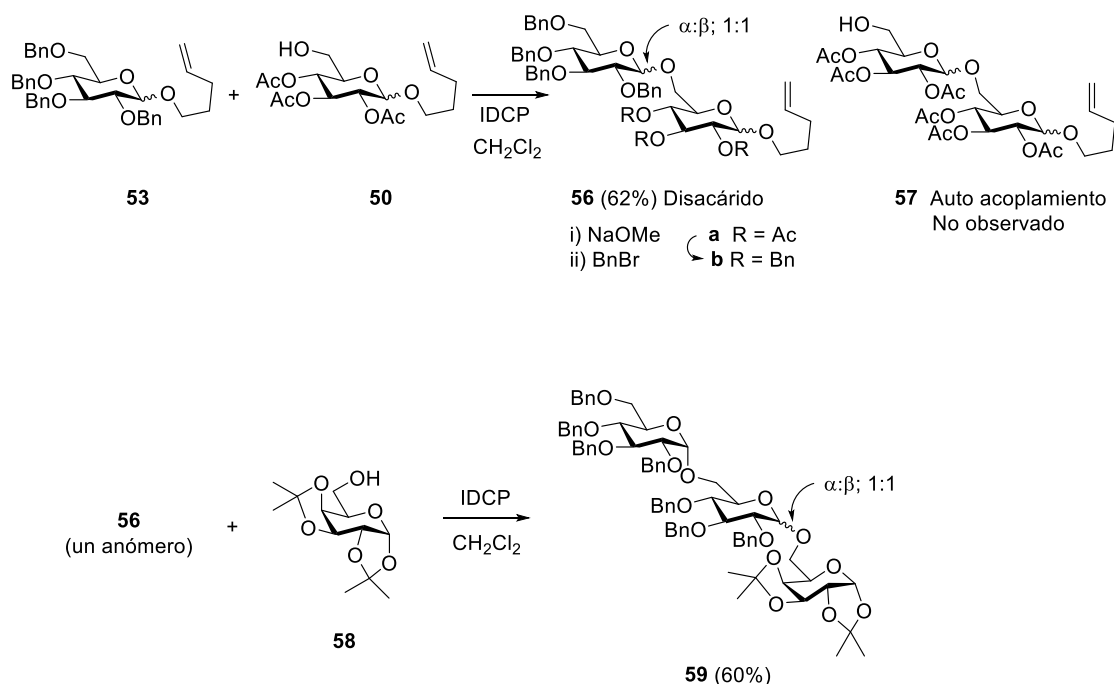
Así, se considera un dador de glicosilo “armado” el que posee grupos protectores con carácter electrodonador (por ejemplo una función éter como en los piranosidos **51**, **53** del Esquema 19. Por otro lado, los dadores que poseen sustituyentes electroattractores (como por ejemplo funciones acilo en el piranosido **50** del Esquema 19, se consideran “desarmados”). Se concluyó que los dadores armados son más reactivos que los dadores desarmados ya que el grupo éster, electrón atractor, desestabiliza una carga positiva en el centro anomérico, desfavoreciendo por tanto la formación del ion oxonio. Por el contrario, un grupo éter, electrón donador, en O-2 estabiliza la formación del ión oxocarbenio postulado como intermedio en las reacciones de glicosidación.

De acuerdo con estas observaciones un donador de glicosilo bencilado, p. ej. **53**, puede ser activado quimioselectivamente en presencia de un donador acilado **50** (electrónicamente desactivado o desarmado), que puede entonces funcionar como aceptor de glicosilo para originar un único disacárido, p. ej. **56** (Esquema 20), como producto final. Este concepto inicialmente descrito para glicósidos de *n*-pentenilo (NPGs),⁹⁵ ha sido extendido a otros tipos de dadores de glicosilo.^{96,97}

⁹⁵ a) Fraser-Reid, B.; Wu Z.; Udodong, U. E.; Ottoson, H. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 6068-6070.

⁹⁶ Kaeothip, S.; Demchenko, A. V. *Carbohydr. Res.*, **2011**, 346, 1371-1388.

⁹⁷ Fügedi, P., en *The Organic Chemistry of sugars*, Eds. Levy, D. E.; Fügedi, P. Taylor and Francis. Boca Raton, Florida **2005**, pp. 89-179.

Esquema 20. Acoplamiento quimioselectivo de glicósidos de *n*-pentenilo.

I.3.2. 1,2-Ortoésteres de pentenilo como dadores de glicosilo

Los ortoésteres de glicosilo fueron descubiertos por Emil Fischer y col. en 1920,⁹⁸ aunque tuvieron que transcurrir más de 10 años hasta que Freudenberg,⁹⁹ Braun,¹⁰⁰ Haworth y sus colaboradores¹⁰¹ consiguieran elucidar su estructura química. De hecho, la asignación estructural fue facilitada por la observación de que los ortoésteres en medio ácido sufren una transposición del residuo de alcoxilo desde el ortoéster al carbono anomérico. Este proceso fue pronto reconocido como inherente a los ortoésteres y una limitación para su posible empleo como dadores de glicosilo, debido a que en las condiciones ácidas requeridas para la glicosidación el residuo alcoxilo saliente del ortoéster (OR, Esquema 21a) competiría con el aceptor de glicosilo “externo” (p. ej. ROH, Esquema 21b) generando mezcla del glicósido deseado y el correspondiente ortoéster transpuesto.

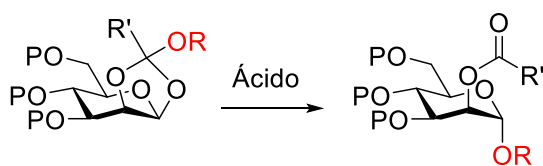
⁹⁸ Fischer, E.; Bergmann, M.; Rabe, A. *Chem. Ber.*, **1920**, 53, 2362–2368.

⁹⁹ Freudenberg, K.; Scholz, H. *Chem. Ber.*, **1930**, 63, 1969–1972.

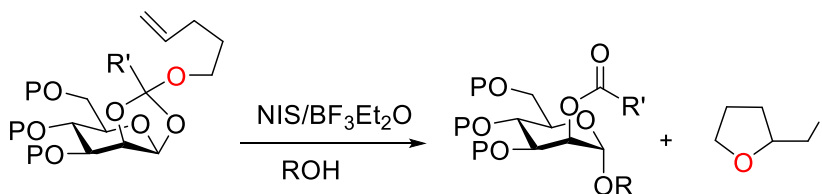
¹⁰⁰ Braun, E. *Chem. Ber.*, **1930**, 63, 1972–1974.

¹⁰¹ Bott, H. G.; Haworth, W. N.; Hirst, E. L. *J. Chem. Soc.*, **1930**, 1395–1405.

a) Reacción de transposición



b) Reacción de activación NPOEs

**Esquema 21.** Transposición de ortoésteres y activación de NPOEs.

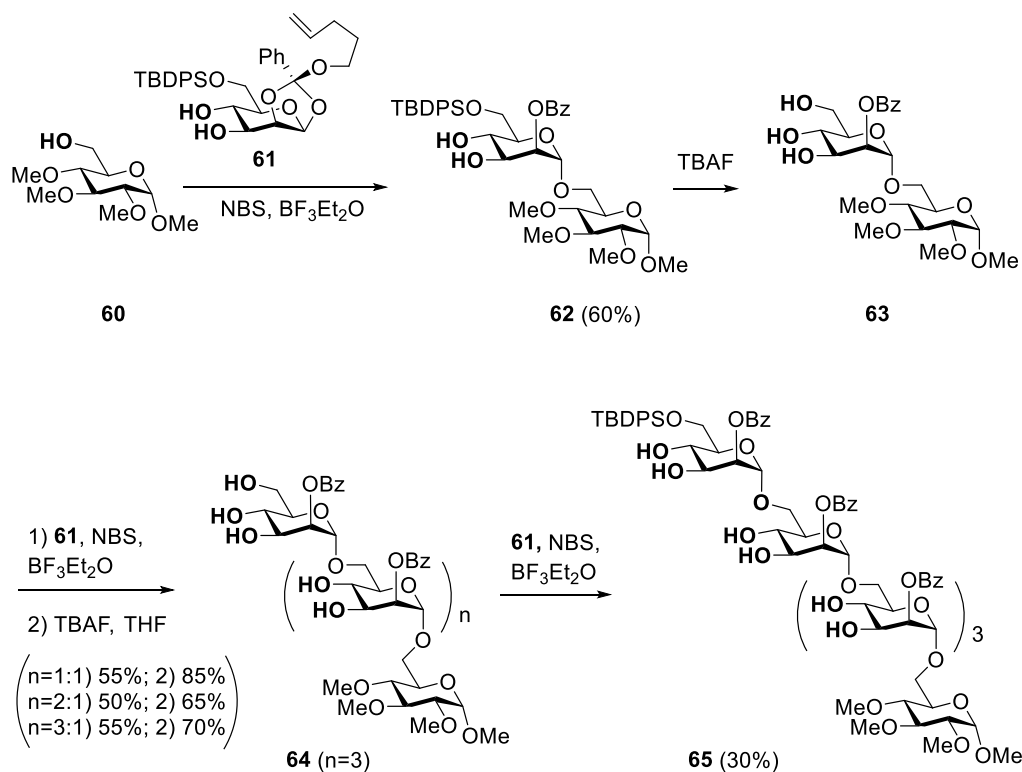
Para evitar este proceso, Fraser-Reid y colaboradores plantearon el uso de los ortoésteres de pentenilo como nuevos donadores de glicosilo¹⁰² (Esquema 21b). El éxito de este tipo de ortoésteres radicaba en que mediante la activación por iones halonio, p. ej. I^+ , análoga a la ya comentada para glicósidos de *n*-pentenilo, el grupo saliente no es el alcohol *n*-pentenílico, sino un yodometil-tetrahidrofurano no nucleófilo, y que por tanto ya no puede competir con el alcohol (ROH) aceptor de glicosilo.

Así, los ortoésteres de *n*-pentenilo se han postulado como una alternativa más reactiva a los glicósidos de pentenilo y se han empleado en la síntesis de moléculas de interés.¹⁰³ En colaboración con el grupo del Prof. Fraser-Reid, el grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis doctoral ha estado implicado en estudios encaminados al desarrollo de estrategias que simplifiquen los procesos de glicosidación. La mayoría de estos estudios, se han basado fundamentalmente en la utilización de ortoésteres de pentenilo derivados de piranosas. Así, se ha comprobado que estos donadores, permiten realizar acoplamiento regioselectivos en los que la reacción de glicosidación en sistemas de polioles, p. ej. **63** ó **64**, transcurre de manera preferente sobre un único hidroxilo, obviando la necesidad de pasos adicionales de protección y desprotección (Esquema 22).¹⁰⁴

¹⁰² Fraser-Reid, B.; López, J. C.; *Orthoesters and Related Derivatives* B., Cap. 5.1 en Demchenko, A. V., *Handbook of Chemical Glycosylation. Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*, Ed.: Demchenko, A. V., Wiley-VCH; **2008**.

¹⁰³ a) Mach, M.; Schlueter, U.; Mathew, F.; Fraser-Reid, B.; Hazen, K. C. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 7345-7354. b) Jayaprakash, K. N.; Lu, J.; Fraser-Reid, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 5894-5898.

¹⁰⁴ López, J. C.; Agocs, A.; Uriel, C.; Gómez, A. M.; Fraser-Reid, B. *Chem. Commun.*, **2005**, 5088-5090.



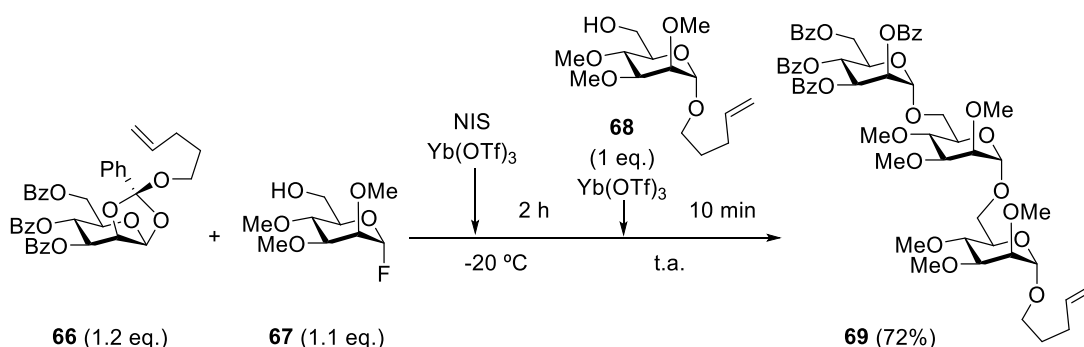
Esquema 22: Síntesis regioselectiva de oligosacáridos.

También han facilitado el acoplamiento *one-pot* (o en una sola operación sintética) de varios monosacáridos, bien mediante la incorporación secuencial de los diferentes aceptores de glicosilo, o bien en reacciones de varios componentes.

Por otro lado, los ortoésteres de pentenilo (NPOEs) pueden participar en glicosidaciones de tipo ortogonal.¹⁰⁵ En el Esquema 23 se muestra la activación selectiva del NPOE **66** en presencia del fluoruro de glicosilo **67**. El disacárido intermedio generado puede a su vez actuar como donador de glicosilo en presencia de un NPG (**68**) que participa como aceptor de glicosilo. El resultado es la síntesis quimioselectiva del trisacárido **69**.¹⁰⁶

¹⁰⁵ En el contexto de las reacciones de glicosidación, el término ortogonal hace referencia a la utilización de dos grupos salientes diferentes en las dos unidades de azúcar a combinar y que se activan bajo condiciones químicas distintas. Ver Kanie, O.; Ito, Y.; Ogawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12073-12704.

¹⁰⁶ López, J. C.; Uriel, C.; Guillaumon-Martín, A.; Valverde, S.; Gómez, A. M. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 2759-2762.



Esquema 23. Síntesis del trisacárido **69**. Activación del ortoésteres de pentenilo **66** en presencia del fluoruro de glicosilo **67**.

Por otra parte, y dado los pocos precedentes que existían en la literatura, de donadores de glicosilo en derivados de furanosa, se decidió analizar el comportamiento de ortoésteres de pentenilo en furanósidos. Es importante destacar que los derivados de furanosa presentan una menor estabilidad termodinámica que los derivados de piranosa,¹⁰⁷ pero aun así se han podido emplear con éxito en reacciones de glicosidación (Esquema 24).^{108,109,110,111,112}

¹⁰⁷ Collins, P. M.; Ferrier, R. J., *Monosaccharides: Their Chemistry and their Roles in Natural Products*; Eds. John Wiley & Sons; New York, **1995**.

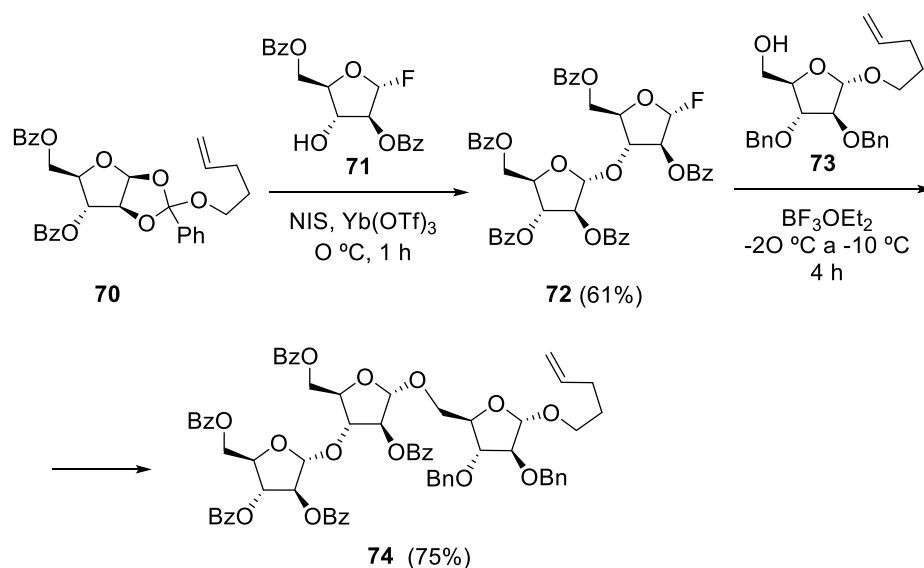
¹⁰⁸ Mach, M.; Schlueter, U.; Mathew, F.; Fraser-Reid, B.; Hazen, K. C. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 7345–7354.

¹⁰⁹ a) Jayaprakash, K. N.; Lu, J.; Fraser-Reid, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 5894-5898. b) Jayaprakash, K. N.; Chaudhuri, S. R.; Murty, C. V.; Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5534-5445. c) Katano, K.; Chang, P. I.; Millar, A.; Pozsgay, V.; Minster, D. K.; Ohgi, T.; Hecht, S. M. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 5886-5887. d) Beignet, J.; Tiernan J.; Woo, C. H.; Kariuki, B. M.; Cox, L. R. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 6341–6356.

¹¹⁰ a) Sureshkumar, G.; Hotha, S. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 6564-6568. b) Roberts, C.; Madsen, R.; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1546-1553. c) Zhu, Y.; Kong, F. *Synlett*, **2000**, *12*, 1783-1787.

¹¹¹ Fraser-Reid, B.; Lu, J.; Jayaprakash, K. N.; López, J.C. *Tetrahedron Asymmetry*, **2006**, *17*, 2449-2592.

¹¹² Jayaprakash, K. N.; Radhakrishnan, K. V.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 6953-6955.



Esquema 24. Reacción de O-glicosidación con ortoésteres de pentenilo derivados de furanosa.

A la vista de estos antecedentes, en este Capítulo nos propusimos emplear los ortoésteres de pentenilo derivados de furanosa como dadores de glicosilo en la preparación de nucleósidos. Como hemos mencionado anteriormente, el empleo de ortoésteres como dadores de glicosilo garantiza una orientación 1,2-trans en el enlace glicosídico, y simultáneamente facilita la diferenciación de O-2' respecto a O-3' y O-5' en el nucleósido final.

I.4 Resultados y discusión

En esta sección se abordará la descripción de los métodos de síntesis que han permitido la preparación de los ortoésteres de *n*-pentenilo derivados de ribosa, y a continuación, se detallarán los estudios de reactividad que han permitido su conversión en nucleósidos bajo las condiciones Vorbrüggen.

En primer lugar se discutirá la síntesis de los ortoésteres de pentenilo que serán empleados como donadores de glicosilo en la reacción de acoplamiento a partir de los azúcares libres. Con la finalidad de evaluar la importancia de los diferentes grupos protectores de las funciones hidroxilo en la reacción de *N*-glicosidación, también se discutirá la posterior derivatización de las funciones hidroxilo presentes en los ortoésteres previamente sintetizados.

I. 4.1 Síntesis de los dadores de glicosilo: 1,2-Ortoésteres de furanosa

El método más habitual para la obtención de 1,2-ortoésteres de piranosas implica una secuencia de tres etapas que incluye: *i*) la acilación directa (benzoylación o acetilación) del azúcar libre (I→II, Figura 6); *ii*) una posterior bromación con HBr/AcOH, de acuerdo con el procedimiento descrito por Ness y Fletcher¹¹³ para la obtención del correspondiente bromuro de glicosilo (II→III, Figura 6); y *iii*) la formación del 1,2-ortoéster (III→IV, Figura 6); por tratamiento con el alcohol adecuado (por ejemplo alcohol n-pentenílico), en presencia de una sal de amonio cuaternaria (NBu₄I) y una base orgánica (normalmente *sim*-colidina o 2,6-lutidina).^{114,115}

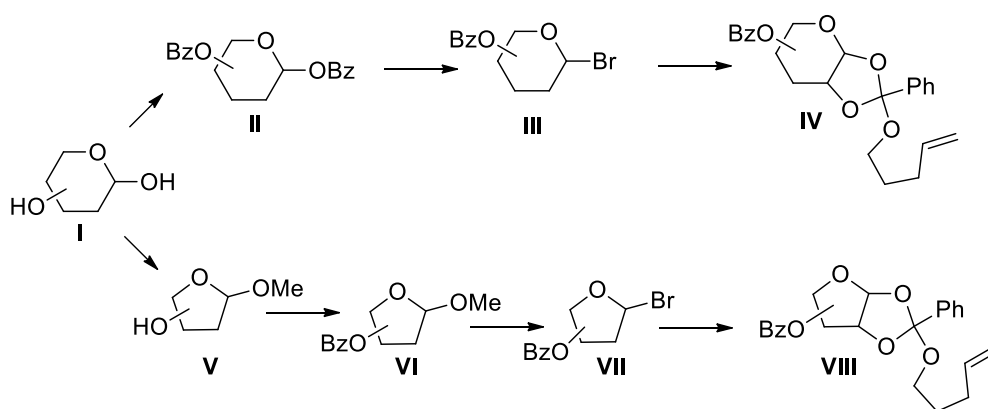


Figura 6. Rutas para la preparación de n-pentenil ortoésteres de piranosa (IV) y furanosa (VIII).

Sin embargo, cuando se desea extrapolar esta estrategia al caso de ortoésteres de furanosa, mucho menos estudiados y empleados que los correspondientes ortoésteres derivados de piranosa, es necesario incorporar una etapa adicional previa a la acilación que consiste en la formación bajo condiciones cinéticas de los correspondientes glicósidos de metilo (I→V, Figura 6). Esta etapa es esencial para garantizar la formación del anillo de 5 miembros deseado.¹¹⁶

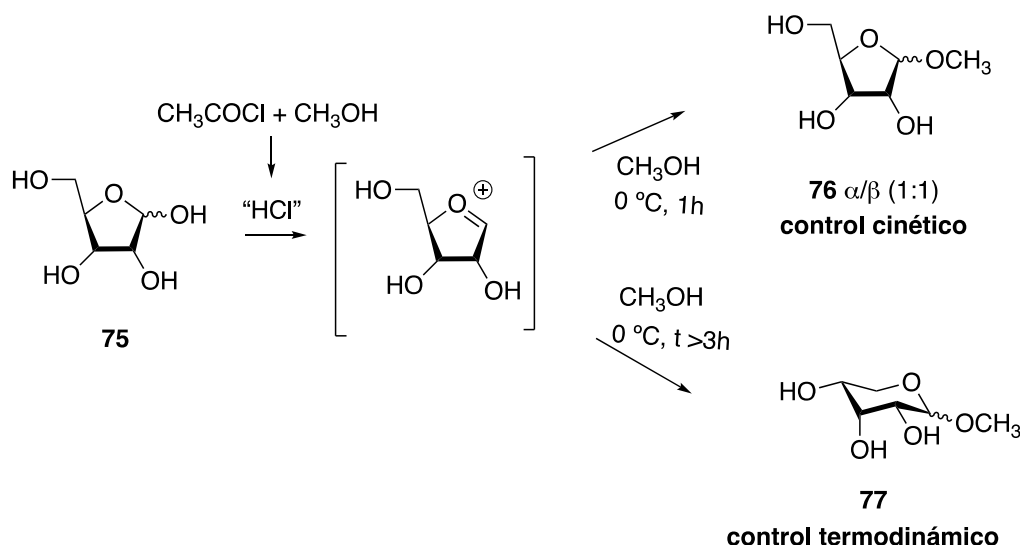
¹¹³ Ness, R.K.; Fletcher, H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 2007-2010.

¹¹⁴ Baeschlin, D. K.; Green, L. G.; Hahn, M. G.; Hinzen, B.; Ince, S. J.; Ley, S. V. *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, *11*, 173-197; Vogel, C.; Torres, G. M.; Reinke, H.; Michalik, D.; Voss, A. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 520-528. c) Adinolfi, M.; Iadonisi, A.; Ravidá, A.; Schiattarella, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5316-5319. d) Plé, K.; Chwalek, M.; Voutquenne-Nazabadioko, L. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4347-4362.

¹¹⁵ Hölemann, A.; Stocker, B. L.; Seeberger, P. H. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8071-8088 b) Beignet, J.; Tiernan, J.; Woo, C. H.; Kariuki, B. M.; Cox, L. R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6341-6353.

¹¹⁶ Ramamurty C. V. S.; Ganney, P.; Rao, C. S, Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2245-2247.

De acuerdo con esta estrategia general, y por analogía a las condiciones propuestas por Lowary y colaboradores para D-arabinosa,¹¹⁷ se obtuvo el ortoéster de ribofuranosa **80** mediante la reacción de glicosidación de tipo Fischer de D-ribosa (**75**) con metanol (MeOH) y empleando como catalizador HCl anhidro (generado *in situ* por reacción de cloruro de acetilo con metanol) (Esquema 25). La reacción se realiza a 0 °C y al monitorizar por cromatografía en capa fina (CCF) se observa que tras 1 h se produce la casi completa desaparición del material de partida y su conversión en los correspondientes glicósidos de metilo **76**, como una mezcla equimolecular de anómeros. Ambos anómeros pueden ser empleados en la etapa posterior de bromación, no siendo por tanto necesaria su separación. Es importante destacar que tiempos de reacción más prolongados favorecen la aparición de los piranosidos de metilo correspondientes **77**, que incluso pueden llegar a ser los productos mayoritarios de la reacción (Esquema 25). Los ribofuranósidos de metilo **76** son los productos del control cinético, mientras que las correspondientes formas piranosídicas **77** son los productos mayoritarios si se permite alcanzar el equilibrio termodinámico.



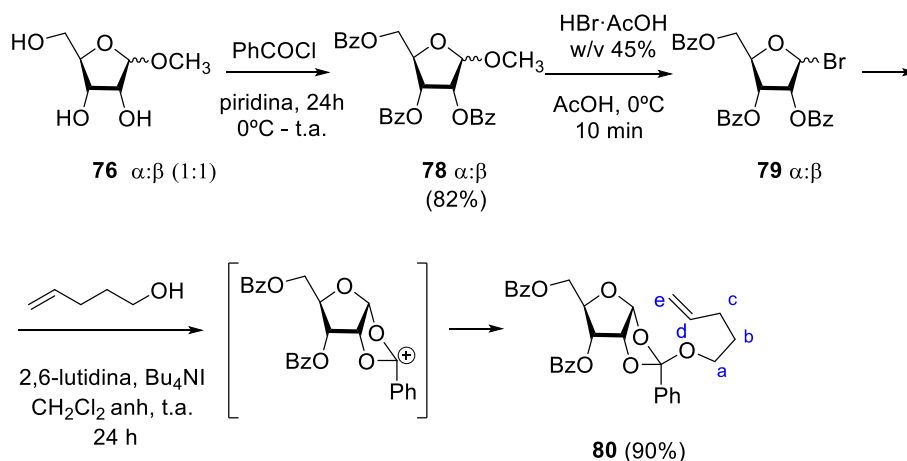
Esquema 25. Formación de furanosidos y piranosidos en la glicosidación de Fischer de D-ribosa.

La benzoilación directa de la mezcla de anómeros **76**, generó los correspondientes tribenzoatos **78**, que fueron purificados por cromatografía en columna. Sobre estos derivados, se lleva a cabo la bromación con $\text{HBr}\cdot\text{AcOH}$, siguiendo el procedimiento descrito por Ness y Fletcher,¹¹⁸ obteniéndose el derivado bromado de

¹¹⁷ a) Callam, C. S; Lowary, T. L. *J. Chem. Educ.* **2001**, 78, 73-74. b) Liu., C.; Richards, M. R.; Lowary, T. L. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4992-5007. c) Joe, M.; Bai, Y.; Nacario, R. C.; Lowary, T. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9885-9901.

¹¹⁸ Ness, R.K.; Fletcher, H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 2007-2010.

ribofuranosa **79**, que debido a su inestabilidad no puede ser almacenado, ni cromatografiado, y es inmediatamente empleado en la siguiente etapa. Así, el tratamiento del bromuro **79** con alcohol *n*-pentenílico en CH₂Cl₂ en presencia de yoduro de tetrabutilamonio y 2,6-lutidina nos permitió obtener el ortoéster de pentenilo **80** con un 90% de rendimiento en los dos últimos pasos. Al ser únicamente necesarias dos purificaciones, la ruta de síntesis resulta ser bastante eficiente (Esquema 26).



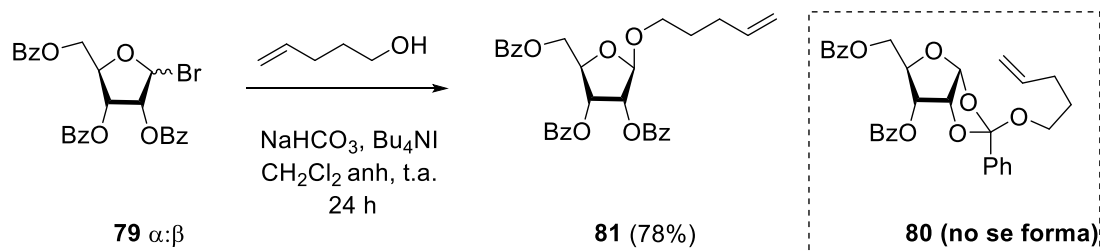
Esquema 26. Síntesis del ortoéster de pentenilo de la ribofuranosa **80**.

El compuesto **80**, presenta en su espectro de ¹H-RMN una señal a 5.76 ppm (multiplete) atribuida al protón olefínico del grupo pentenilo (H_d) y una señal a 6.24 ppm (doblete) que presenta una *J*_{1,2} = 4.5 Hz, que corresponde al protón anomérico de configuración β del anillo de ribosa. Además en el espectro de ¹³C-RMN, se observan dos señales a δ = 123.6 y 104.7 ppm, atribuibles al carbono del ortoéster y al carbono anomérico, respectivamente. Por otro lado, el espectro de masas obtenido para el compuesto **80** estaba de acuerdo con la estructura asignada.

Si bien ya disponíamos de un buen método para la preparación del ortoéster de ribosa **80**, el escalado de la reacción generaba ocasionalmente el producto final contaminado con 2,6-lutidina. A fin de evitar esto, decidimos ensayar el método alternativo propuesto por Wei *et al* para la preparación de 1,2-ortoésteres, basado en el empleo de bicarbonato sódico anhidro en lugar de la base orgánica.¹¹⁹ Sin embargo, al hacer reaccionar el bromuro de ribosa **79** con alcohol pentenílico, yoduro de tetrabutilamonio (Bu₄NI) y bicarbonato sódico (NaHCO₃) se obtuvo exclusivamente el glicósido de pentenilo **81**, probablemente originado por transposición del ortoéster **80** (Esquema 27). A la vista de estos resultados, se siguió utilizando 2,6-lutidina para la

¹¹⁹ Wei, S.; Zhao, J.; Shao, H. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 1733-1737.

síntesis de NPOE derivados de la ribosa, y en aquellas ocasiones en las que el producto final aparece contaminado con 2,6-lutidina se procede a hacer una extracción posterior con una disolución acuosa al 10-15% de CuSO_4 .



Esquema 27. Intento de formación del ortoéster **80** con NaHCO_3 como base.

I.4.2. Síntesis de aceptores de glicosilo: bases nitrogenadas sililadas (púricas y pirimidínicas)

Como ya se ha discutido previamente, la reacción de Vorbruggen requiere la presililación de la base nitrogenada antes de su acoplamiento con el ortoéster de ribosa **80**.

En la literatura existen múltiples condiciones para efectuar la reacción de sililación siendo el principal problema la relativa rapidez de hidrólisis de las bases sililadas que requieren el uso de condiciones de reacción estrictamente anhidras. Este hecho condiciona que los tiempos descritos para la reacción de sililación varíen desde 1 h hasta más de 24 h, y que deban ser optimizados para cada base. Otro inconveniente adicional es que las bases nitrogenadas exhiben una muy pobre solubilidad en los disolventes más habituales lo que suele conllevar reacciones de baja reproducibilidad.

Desde un punto de vista práctico, la reacción se lleva a cabo calentando un agente sililante y la correspondiente base nitrogenada. Como agentes sililantes se han empleado cloruro de trimetilsililo (TMSCl)¹²⁰, hexametildisilazano (HDMS)¹²¹, N-(trimetilsilil)imidazoles,¹²² trimetilsililacetato de etilo,¹²³ ó trimetilsililacetales de ceteno.¹²⁴ El HMDS es un reactivo estable, de manejo sencillo, asequible y comercialmente disponible y es considerado el reactivo de elección para la sililación de

¹²⁰ Langer, S. H.; Connell, S.; Wender, I. *J. Org. Chem.*, **1958**, 23, 50-58.

¹²¹ Pinnick, H. W.; Bal, B. S.; Lajis, N. H. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 19, 4261-4262.

¹²² Corey E. J.; Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6190-6191.

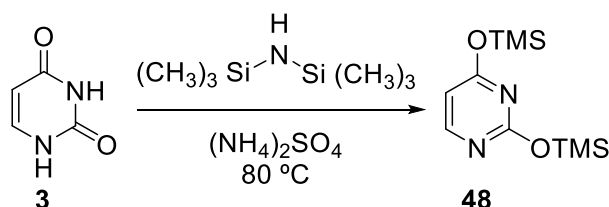
¹²³ Nakamura, E.; Hashimoto, K.; Kuwajima, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1981**, 54, 805-808.

¹²⁴ Kita, Y.; Haruta, J.; Segawa, J.; Tamura, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 44, 4311-4314.

las bases.¹²⁵ Sin embargo, debido a su pobre capacidad sililante y a la baja nucleofilia de las nucleobases, se suele requerir la adición de un activador. La combinación de sulfato amónico y/o TMSCl con HMDS es la más extendida en la bibliografía para la sililación de las bases.

Con estos precedentes, se procedió a ensayar la sililación del uracilo con HMDS en presencia de sulfato amónico anhidro en diferentes condiciones de reacción (Tabla 1). Es de destacar que debido a la inestabilidad de 2,4-bis((trimetilsilil)oxi)pirimidina **48**, la evolución de la reacción no se puede seguir por cromatografía en capa fina (CCF). Sin embargo, dado que el uracilo libre no es soluble a 80 °C en HMDS pero si lo es el uracilo sililado, consideramos que la reacción había finalizado cuando la mezcla presentaba un aspecto transparente y había desaparecido toda turbidez.

Tabla 1. Reacción de sililación de uracilo. Efecto de la cantidad de HMDS y catalizador.



Entrada ^a	HMDS (eq.)	Catalizador (eq.)	t (h)	Resultados
1	1 eq.	-	24	Persiste precipitado
2	1.5 eq.	-	24	Persiste precipitado
3	2 eq.	-	24	Persiste precipitado
4	2.5 eq.	-	12	Total disolución
5	3 eq.	-	12	Total disolución
6	2.5 eq.	TMSCl (0.1 eq.)	3	Total disolución
7	2.5 eq.	TMSOTf (0.1 eq.)	3	Total disolución

^a La reacción se llevó a cabo con 1 equivalente de **3** en presencia de 0.2 equivalentes de (NH₄)₂SO₄, HMDS a 80 °C.

¹²⁵ a) Cossy, J.; Pale, P. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 6093-6109. b) Torkelson, S.; Ainsworth, C. *Synthesis*, **1976**, 722-724.

De los resultados mostrados en la Tabla 1, se pudo deducir como mejores condiciones de reacción las que empleaban 2,5 equivalentes de HMDS por equivalente de uracilo (Tabla 1, entrada 4). El empleo de cantidades superiores a 2,5 equivalentes de HMDS no parecía mejorar el rendimiento de la reacción ni acortar los tiempos de la misma (Tabla 1, entrada 5).

Con la finalidad de acelerar el proceso se decidió hacer dos ensayos adicionales en los que la reacción de sililación se realizaba en presencia de un ácido de Lewis: TMSCl ó triflato de trimetilsililo (TMSOTf) (Tabla 1, entradas 6 y 7). En ambos casos se observó una mejora considerable en el tiempo de reacción (3 h frente a 12 h, comparar en la Tabla 1 la entrada 4 con las entradas 6 y 7). Puesto que el TMSCl es más estable frente a la hidrólisis que el TMSOTf, y además mucho más asequible, la combinación de HDMS/(NH₄)₂SO₄/TMSCl fue la seleccionada para ensayar la reacción de *N*-glicosidación. El protocolo se puso a punto con uracilo, pero a lo largo de esta memoria se ha empleado con todas las bases nitrogenadas analizadas.

I.4.3. Ensayo de *N*-glicosidación

A continuación, se estudió la viabilidad de la reacción de Vorbruggen empleando ortoésteres de pentenilo como donadores de glicosilo. De acuerdo con los precedentes del uso de *n*-pentenil ortoésteres, las reacciones de glicosidación, requieren el uso de una fuente de ión yodonio y un ácido de Lewis (Figura 7). En estas condiciones, la activación del NPOE **80** se producirá de forma remota por ataque del ión yodonio sobre el doble enlace terminal del grupo *n*-pentenilo generando el intermedio **A** (Figura 7). Este intermedio evoluciona hacia la formación del ión furanilio **B** que por expulsión de 2-yodometilfurano¹²⁶ genera el ión dioxolenio¹²⁷ **C** que finalmente será el que experimente el ataque nucleófilo en la reacción de glicosidación.

¹²⁶ Mach, M.; Schlueter, U.; Mathew, F.; Fraser-Reid, B.; Hazen, K.C. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 7345-7454.

¹²⁷ Fraser-Reid, B.; Grimme, S.; Piacenza, M.; Mach, M.; Schlueter, U. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4687-4692.

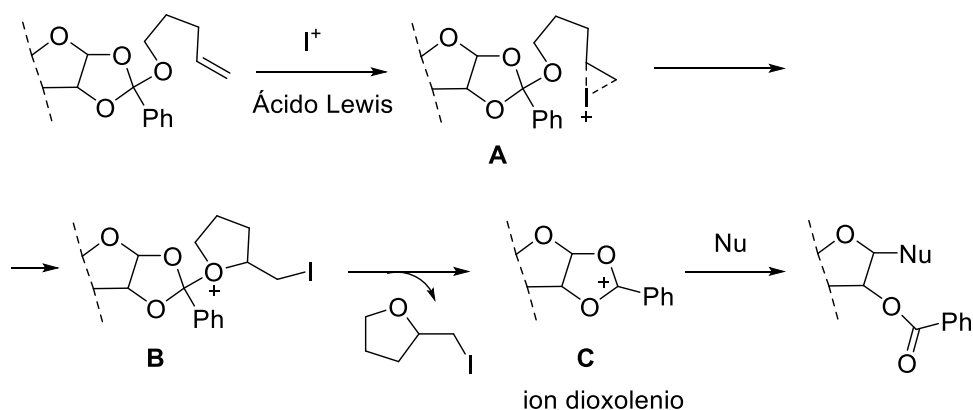
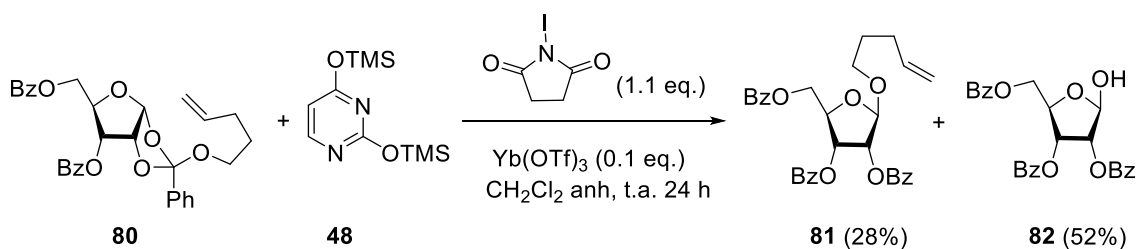


Figura 7. Activación de NPOEs en reacciones de glicosidación.

Desde un punto de vista práctico, decidimos comenzar con un estudio detallado del acoplamiento entre el ortoéster **80** y el uracilo sililado **48** (Esquema 28). De este modo, pensamos, quedarían sentadas las bases para extender la metodología a la síntesis de cualquier otro nucleósido, pudiendo ser modificados tanto el ortoéster como la nucleobase de partida.

En los primeros ensayos se trató el 1,2-ortoéster de pentenilo **80** con el uracilo sililado **48** (1 equivalente), preparado *in situ* por tratamiento del uracilo **3** con HDMS (2.5 equiv.) y TMSCl (0.1 equiv.) en presencia de $(NH_4)_2SO_4$ y empleando como activadores N-yodosuccinimida (NIS) (1.1 equiv.) y $Yb(OTf)_3$ (0.1 equiv.). Cuando se empleó CH_2Cl_2 como disolvente, no se observó la formación del producto de acoplamiento deseado sino que por el contrario se aprecia la obtención de dos nuevos productos **81** y **82**, cuya formación se atribuyó a procesos de transposición e hidrólisis del ortoéster de partida, respectivamente.



Esquema 28. Reacción de N-glicosidación de **80** con **48**

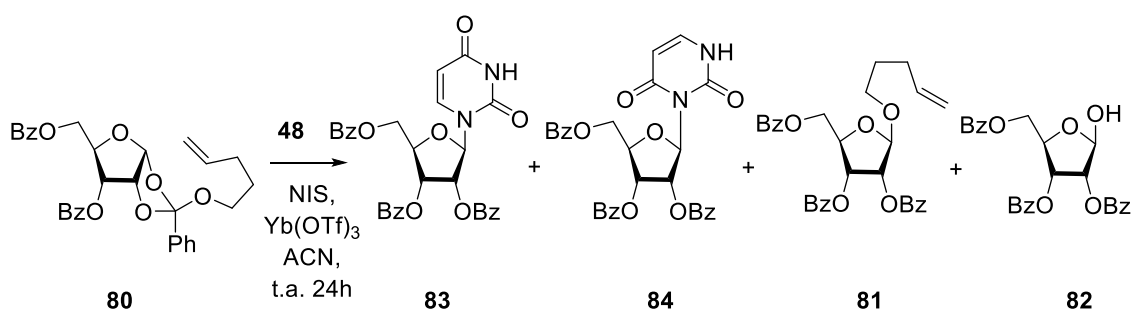
A continuación se llevaron a cabo ensayos en acetonitrilo (ACN) (disolvente común en la mayoría de las reacciones de N-glicosidación). En un primer ensayo empleando cantidades equimolares de NPOE **80** y uracilo **48**, no se observó formación del nucleósido deseado, incluso tras 24 h de reacción. Sin embargo, en base a un

análisis por CCF, el ortoéster parecía permanecer inalterado mientras que se podía apreciar la aparición de un precipitado, que atribuimos a un proceso de hidrólisis del uracilo sililado. Ante estos resultados, se decidió aumentar la cantidad de uracilo (1.5, 2, ó 3 equivalentes, Tabla 2), manteniendo las mismas condiciones de reacción.

En primer lugar se puso de manifiesto que se requerían al menos dos equivalentes de uracilo para provocar la desaparición del ortoéster de partida **80** (Tabla 2, entrada 2). Adicionalmente, el aumento de 2 a 3 equivalentes de uracilo sililado no suponía ningún cambio ni cualitativo ni cuantitativo en los resultados de la reacción (Tabla 2, entrada 3). En todos los casos se observaba junto con estructuras de tipo nucleósido (**83**, **84**), los productos de transposición e hidrólisis, **81** y **82**, respectivamente.

Desde un punto de vista práctico, la reacción se lleva a cabo con el uracilo sililado *in situ*, (80 °C, 3 h, HMDS, TMSCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Esta mezcla, se deja enfriar y se elimina el exceso de HMDS a vacío manteniendo condiciones anhidras. A continuación se disuelve el uracilo sililado en ACN y sobre esta disolución se adiciona el NPOE **80** (1 equiv.) disuelto en ACN, NIS (1.1 equiv.) y $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (0.1 equiv.). La reacción se mantiene a temperatura ambiente (t.a.) en atmósfera de argón durante 24 horas (Tabla 2).

Tabla 2. Reacción de *N*-glicosidación. Efecto de la cantidad de uracilo aceptor.



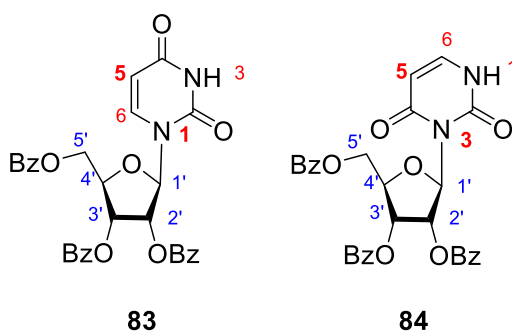
Entrada ^a	Base (eq.) 48	Rto.(%) 83	Rto.(%) 84	Rto.(%) 81	Rto.(%) 82
1 ^b	1.5 eq.	18	trazas	30	12
2	2 eq.	45	10	28	14
3	3 eq.	47	12	27	13

^a La reacción se lleva a cabo con 1 equivalente de **80** en presencia de 0.5% equivalentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, HMDS a 80 °C. ^b Se recupera un 20% de **80**.

La asignación estructural de los nuevos productos **83** y **84** se realizó en base a los espectros monodimensionales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN y fue corroborada por la adquisición de espectros bidimensionales y de espectrometría de masas. En el espectro de ^1H -RMN de ambos β -nucleósidos han desaparecido las señales correspondientes al grupo pentenilo, mientras que se pueden observar señales correspondientes a los H-anoméricos de β -nucleósidos: δ 6.32 ppm, doblete $J_{1'-2'} = 5.6$ Hz para el N-1- β -nucleósido **83**, y δ 6.36 ppm, doblete $J_{1'-2'} = 6.1$ Hz correspondiente al N-3- β -nucleósidos **84**, ambos muestran unos valores de las constantes de acoplamiento característicos de los hidrógenos H-1' y H-2' en disposición 1,2-trans. Estos datos están en concordancia con el conocido efecto director 1,2-trans de los ortoésteres de glicosilo en reacciones de glicosidación.

Por otro lado, tal y como se muestra en la Tabla 3 el desplazamiento químico del protón H-5 aparece a 5.60 ppm en N-1- β -nucleósidos, mientras que para N-3- β -nucleósidos la señal de H-5 se desapantalla hasta la zona aromática observándose en torno a δ 7.64-7.46 ppm.

Tabla 3. ^1H -RMN de los compuestos **83** y **84**



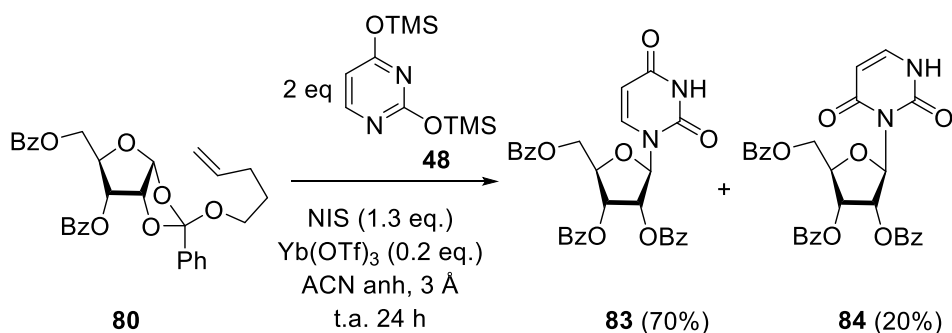
Compuesto	N-H	H-1'β	H-2'	H-5	H-6
83	8.41, s	6.32, d	5.89, dd	5.60 d	7.44-7.32 ^a
N-1- β -nucleósidos		$J_{1'-2'}=5.6$	$J_{2'-3'}=4.3$	$J_{5-6}=8.2$	
84	8.92, s	6.36, d	5.9 dd	7.64-7.46 ^a	7.43-7.31 ^a
N-3- β -nucleósidos		$J_{1'-2'} = 6.1$	$J_{2'-3'}=3.5$		

^a señales que aparecen solapadas con las señales de los H-aromáticos impidiendo la lectura de las constantes de acoplamiento.

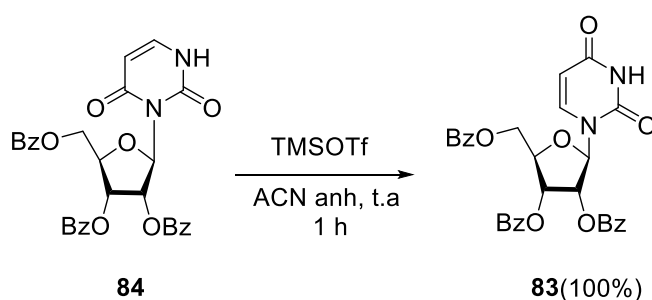
Aunque ya habíamos conseguido llevar a cabo la reacción de acoplamiento, la presencia de los productos de hidrólisis (**82**) y de transposición (**81**), hacía disminuir considerablemente el rendimiento de la reacción de *N*-glicosidación. A fin de optimizar el proceso, la reacción se llevó a cabo en presencia de tamices moleculares, con el fin de reducir el producto de hidrólisis, y se elevó el número de equivalentes de NIS recristalizada (de 1,1 a 1,3 equiv.) para que la reacción transcurriese vía adición de ion yodonio al doble enlace terminal del NPOE de acuerdo a lo señalado en la Figura 7, minimizando por tanto el proceso de transposición NPOE (**80**)→NPG (**81**).

De acuerdo con estas últimas mejoras, la reacción de *N*-glicosidación se lleva a cabo empleando uracilo **3** (2 equiv.), HMDS (5 equiv.), TMSCl (0,2 equiv.) y (NH₄)₂SO₄ (0.4 equiv.) como agente desecante. La reacción se calienta a 80 °C y se deja agitando a esa temperatura durante tres horas en atmósfera inerte. Transcurrido ese tiempo, la reacción se enfría y se elimina el exceso de HMDS a vacío y en condiciones anhidras. A continuación se disuelve el uracilo silylado en ACN anhidro y sobre esta disolución se adicionan tamices moleculares, NPOE (1 equiv.) disuelto en ACN anhidro, seguido de Yb(OTf)₃ (0.2 equiv.) NIS (1,3 equiv.). Tras 24 horas de reacción, se observa la formación del nucleósido unido por N-1, **83** (70 %) junto al nucleósido N-3, **84** (20%) (Esquema 29a). En estas condiciones de reacción los productos de hidrólisis y transposición desaparecieron casi por completo. Por otro lado, el tratamiento del regioisómero N-3 **84**, (producto de control cinético), con triflato de trimetilsililo durante una hora produce la completa isomerización al nucleósido N-1 **83** (Esquema 29b).

a) Reacción de N-glicosidación

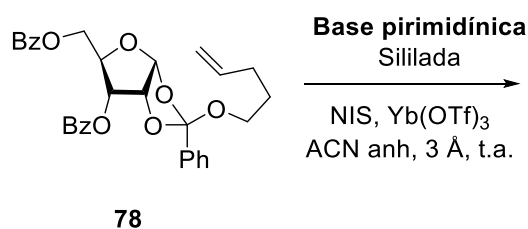


b) Reacción de isomerización β-nucleósido N-3 a β-nucleósido N-1



Esquema 29. a) Reacción de N-glicosidación. b) reacción de isomerización del uracil nucleósido N-3 al nucleósido N-1.

Con el fin de ampliar este estudio, decidimos evaluar la versatilidad de la metodología modificando las nucleobases que actúan como aceptor. Para ello, el NPOE **80** se hizo reaccionar en primer lugar con distintas bases pirimidínicas (**3**, **4**, **85** y **86**), que previamente habían sido sililadas *in situ* con el sistema de HMDS, TMSCl y (NH₄)₂SO₄. La reacción de glicosidación siempre se realizó en presencia de NIS/ Yb(OTf)₃/CH₃CN/ y tamices moleculares, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4: N-glicosidación del NPOE dibenzoilado **80** con diferentes bases pirimidínicas.

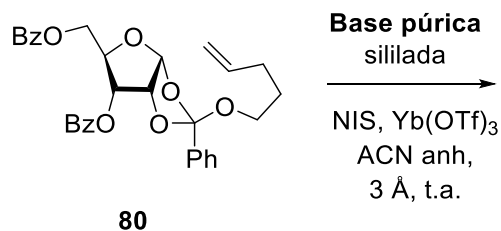
Entrada ^a	Base Pirimidínica	Producto Nucleósido	t (h)	Rto. (%)
1			4	92
2			4	97
3			2	82
4		-	24	-

^a La reacción se lleva a cabo con 1 equivalente de **80** y 2 equivalentes de base sililada en presencia de 1.3 equivalentes de NIS, 0.2 equivalentes de Yb(OTf)₃ y tamices moleculares 3 Å en ACN anhidro, a temperatura ambiente.

El uracilo **3** y la timina **4** originaron, tras 4 horas de reacción, excelentes rendimientos de los nucleósidos **83** y **87** (92 y 97%, Tabla 4, entradas 1 y 2, respectivamente). Cuando se usó como base N4-benzoil-citosina **85**, un derivado de la pirimidina con un grupo electro-dador que activa el anillo, el nucleósido **88** fue aislado con un 82% de rendimiento (Tabla 4, entrada 3). En contraste, la reacción de 5-acetiluracilo **86** condujo a una mezcla compleja de reacción en la que no fue posible identificar el nucleósido deseado (Tabla 4, entrada 4). Esta diferencia de comportamiento fue atribuida a la disminución de la nucleofilia de la base como consecuencia de la presencia del grupo atractor de electrones en el anillo de pirimidina.

A continuación decidimos explorar el comportamiento de bases púricas, que habitualmente presentan una menor nucleofilia y suelen dar lugar a acoplamientos menos efectivos. Así, bajo condiciones idénticas a las que habían sido usadas para las pirimidinas, la glicosidación de N6-benzoil adenina **89** con el NPOE **80** produjo, tras una hora de reacción, la total desaparición del material de partida y la formación de dos nuevos productos que fueron identificados como el nucleósido esperado **93** (28% de rendimiento) y el nucleósido desbenzoilado **94** que fue aislado con un 49% de rendimiento (Tabla 5, entrada 1). Este resultado sugiere que los ortoésteres de pentenilo son lo suficientemente reactivos frente a las bases púricas, como para lograr los acoplamientos buscados con buenos rendimientos.

A la vista de estos hechos, se ensayó el acoplamiento con otras purinas tales como 2,6-dicloropurina **90**, 2-amino-6-cloropurina **91**, adenina **4** y N-7-carba-purina **92** (Tabla 5). En todos los casos se pudo aislar el correspondiente β -ribonucleósido con buenos rendimientos (70-85 %). En el caso de adenina, **4**, el rendimiento observado es menor, probablemente debido a un efecto de inhibición del catalizador por el grupo amino libre de la adenina (Tabla 5, entrada 4). Por el contrario, no se obtuvo producto de acoplamiento en la reacción de N7-carbapurina **92** con **80** (Tabla 5, entrada 5).

Tabla 5. N-glicosidación del NPOE dibenzoilado **80** con diferentes bases púricas.

Entrada ^a	Aceptor: Base Púrica	Producto: Nucleósido	t (h)	Rto. (%)
1			18	30
2			4	85
3			3	70
4			24	-

^a La reacción se lleva a cabo con 1 equivalente de **80** y 2 equivalentes de base en presencia de 1.3 equivalentes de NIS, 0.2 equivalentes de Yb(OTf)₃ y tamices moleculares 3 Å en ACN anhidro, a temperatura ambiente.

I.4.4. Estudio de la influencia de los grupos protectores del NPOE en la reacción de *N*-glicosidación.

Como ya se ha discutido previamente, los nucleótidos son elementos estructurales fundamentales de los ácidos nucleicos. El método más común para la síntesis química de oligonucleótidos es el método automatizado del fosforamidito, que fue desarrollado por Caruthers hace tres décadas (Figura 8).^{128,129} Dicho método consiste en la formación de un enlace fosfito triéster internucleotídico entre un nucleósido activado (monómero 2) y un nucleósido unido a una fase sólida por la posición 3' (monómero 1). Una acetilación posterior (capping) previene la adición de posteriores nucleósidos al nucleósido anclado que haya quedado sin reaccionar en la etapa anterior, y minimiza la formación de secuencias no deseadas. A continuación se lleva a cabo la oxidación del fosfito triéster y se repite el proceso [*desprotección*, *acoplamiento*, *capping*, *oxidación*] el número de veces deseado para generar el oligonucleótido de la longitud buscada. Esta estrategia constituye una ruta eficaz y muy asequible para la preparación en fase sólida de oligonucleótidos de ADN.

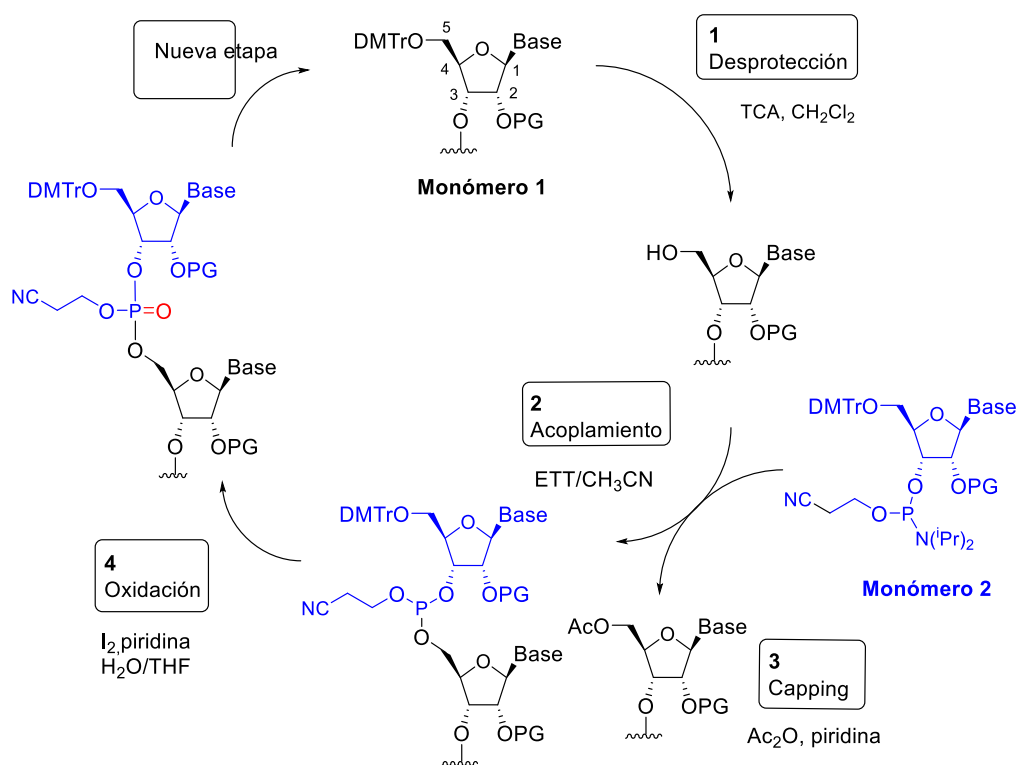


Figura 8. Síntesis química de oligonucleótidos.

¹²⁸ Beaucage, L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 1859–1862.

¹²⁹ McBride, L. J.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 245–248.

Según esto, los nucleósidos deben ser sintetizados previamente al inicio del ciclo de ensamblaje de ADN o ARN.

A diferencia del ADN, en el caso del ARN, la presencia del grupo hidroxilo en C-2' de la ribosarequiere una protección adicional que además debe ser compatible con los grupos protectores empleados para diferenciar los hidroxilos sobre C-3' y C-5'.¹³⁰ *A priori*, la protección en el hidroxilo sobre C-5' se puede lograr sin dificultad al tratarse de un hidroxilo primario. Por ejemplo, está bien establecido que la reacción con un reactivo voluminoso como el dimetoxitritilo (DMTr) garantiza una total selectividad.¹³¹ La diferenciación del hidroxilo en C-2' es, sin embargo, mucho más problemática, y a pesar del gran número de grupos protectores que han sido estudiados, hasta el momento no se ha establecido una solución general, o bien las soluciones existentes son poco eficaces (Figura 9).

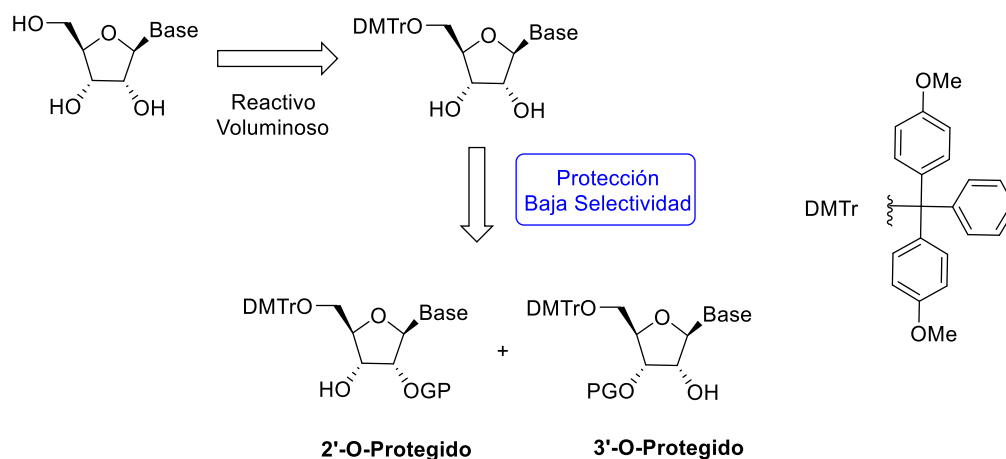


Figura 9. Mezcla resultante de la protección de ribonucleósidos.

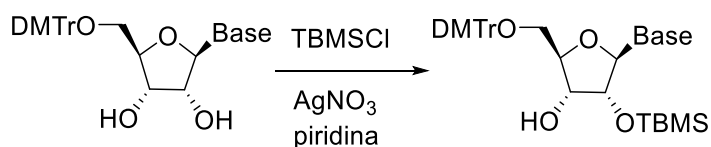
En general la protección directa de la función hidroxilo sobre C-2' se ve comprometida por el hecho que los nucleósidos pueden poseer otras posiciones reactivas incluyendo los nitrógenos nucleofílicos de las nucleobases y la función hidroxilo sobre C-3' (Figura 9). De entre todos los grupos protectores evaluados,¹³² probablemente el que ocupa una posición más destacada es el grupo tertbutildimetilsililo, ya que se instala con selectividad de moderada a buena en presencia de nitrato de plata (AgNO_3) originando nucleósidos protegidos (Esquema 30).¹³³

¹³⁰ Somoza, A. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 2668-2675.

¹³¹ Scaringe, S. A.; Wincott, F. E.; Caruthers, M. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 11820-11821.

¹³² Sproat B. S., in *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, ed. P. Herdewijn, Humana Press, New Jersey, **2005**, vol. 288, p. 17-31.

¹³³ Hakimelahi, G. H.; Proba Z. A.; Ogilvie, K. K.; *Can. J. Chem.*, **1982**, 60, 1106-1113.



Base	U	A	C ^{BZ}	G ^{BZ}	Ph
Rto. (%)	70	65	68	45	35

Esquema 30. Protección selectiva de ribonucleósidos promovida por AgNO₃.

El inconveniente que presenta esta estrategia, sin embargo, es la facilidad con que los ribonucleósidos preparados por el método anterior experimentan procesos de migración de los grupos protectores desde el hidroxilo de C-2' al C-3' (Figura 10).

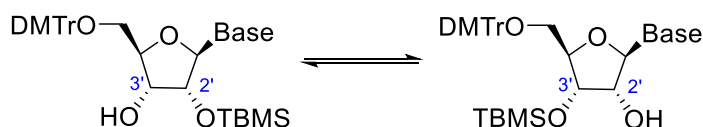


Figura 10. Migración del grupo tertbutildimetilsililo en ribonucleósidos

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y dado que la funcionalidad ortoéster presenta la particularidad de actuar como grupo protector del hidroxilo sobre C-2 y activador de C-1 de la ribosa, pensamos que la *N*-glicosidación de ortoésteres podría suponer una ventaja importante en la diferenciación de los grupos protectores de las funciones hidroxilo sobre C-2', C-3' y C-5'.

Como ya se ha comentado, en las metodologías empleadas en la literatura hasta el momento, la nucleobase se incorpora en las primeras etapas de la síntesis del nucleósido, de tal manera que las modificaciones en la ribosa se deben hacer después de la glicosidación. Sin embargo, la rica funcionalidad de las bases nitrogenadas y las condiciones de reacción pueden no ser compatibles con las modificaciones posteriores.

Una ventaja adicional de la estrategia planteada es que el empleo de ortoésteres de pentenilo permite su activación en condiciones suaves de reacción que son compatibles con los grupos protectores más habituales para la función hidroxilo. Estas condiciones, por tanto, posibilitan modificar el azúcar o la base antes del acoplamiento, permitiendo así la obtención de nucleósidos con funciones hidroxilo diferenciadas. Como ya se ha mencionado, esta diferenciación es fundamental en la síntesis de oligoribonucleótidos (Figura 11).

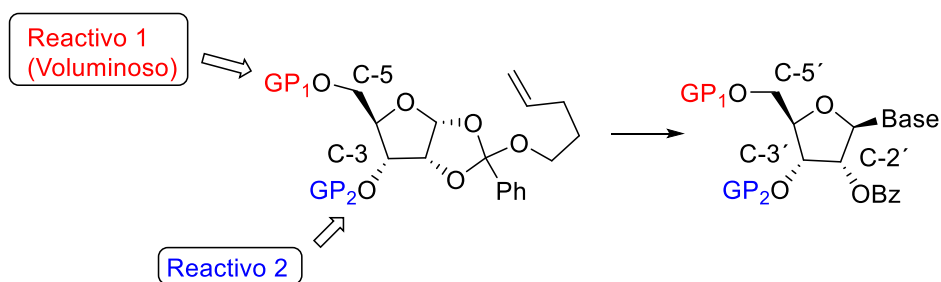


Figura 11. Diferenciación de ribonucleósidos para síntesis de oligonucleótidos.

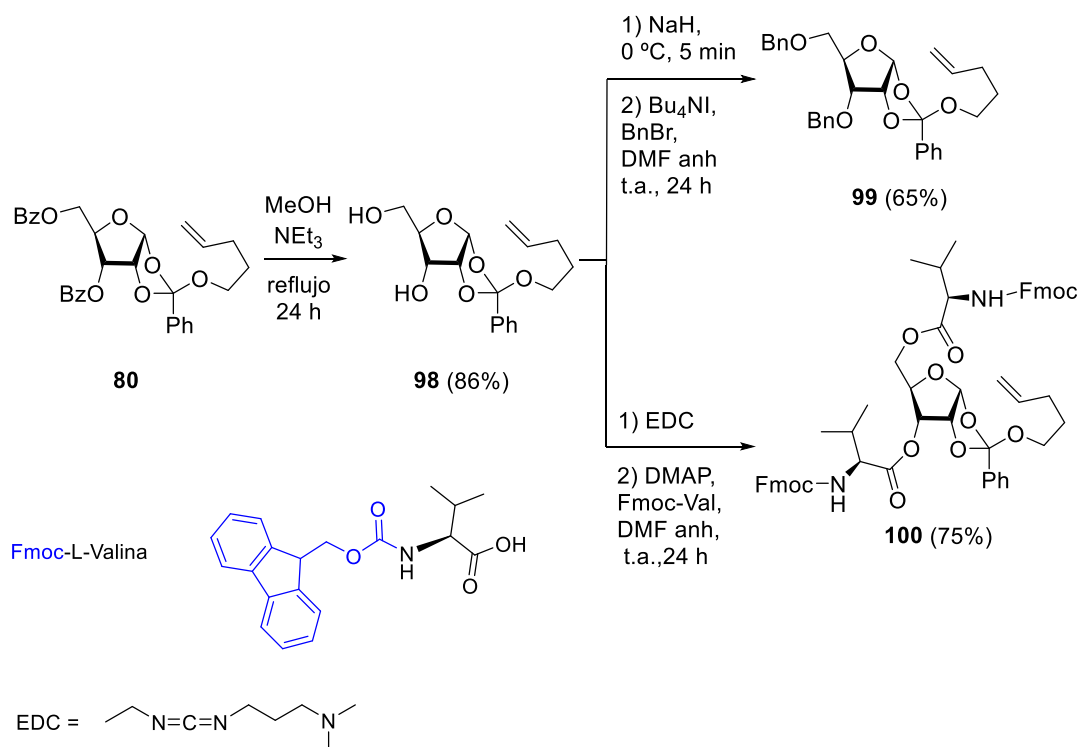
Con este objetivo, y dado que únicamente se había ensayado la reacción con grupos protectores de tipo benzoato en la unidad de ribosa, decidimos en primer lugar estudiar el efecto y la compatibilidad de diferentes grupos protectores en las funciones hidroxilo presentes en el ortoéster en la reacción de *N*-glicosidación.

Para llevar a cabo este objetivo, comenzamos liberando el diol 3,5- del NPOE **80** mediante una desprotección en medio básico (Esquema 31). Pudimos comprobar que las mejores condiciones para realizar la reacción de desbenzoilación consistían en el calentamiento a reflujo del NPOE **80** en una disolución de metanol/trietilamina. Tras una simple concentración del disolvente a vacío seguida de filtración sobre gel de sílice se aísla el diol **98** con un 86% de rendimiento. El empleo del sistema alternativo MeONa/MeOH, seguido de una neutralización con resina ácida (IR-120) es poco reproducible y más problemático ya que dada la labilidad de los ortoésteres al medio ácido en algunos ocasiones se pudo observar una pérdida sustancial de rendimiento del producto buscado **98** como consecuencia de su reordenamiento al correspondiente glicósido de pentenilo.

La funcionalidad ortoéster además es estable a las condiciones habituales de alquilación. Por tanto, la bencilación con hidruro sódico (NaH), y bromuro de bencilo (BnBr) en presencia de yoduro de tetrabutilamonio, de **80** produjo el derivado dibencilado **99** con un 65% de rendimiento (Esquema 31). Este ortoéster presenta el interés de poseer grupos protectores electrodonadores por lo que es previsible que exhibiese una mayor reactividad en las reacciones de *N*-glicosidación que el ortoéster desarmado **80**.

Alternativamente, también decidimos sintetizar el ortoéster **100** que incorpora residuos de L-valina sobre las posiciones C-3 y C-5 de la ribofuranosa. La presencia de residuos de valina puede mejorar significativamente las propiedades biológicas de

algunos nucleósidos (por ejemplo el antitumoral FO-152 frente al fluorouracilo;¹³⁴ como inhibidores de la UDP-glucuronosil transferasa,¹³⁵ o como antifúngicos¹³⁶). Con este objetivo se trató el diol **98** en las condiciones de esterificación mediada por una diimida (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) con un derivado N-prottegido del aminoácido L-valina.



Esquema 31. Derivatización del 1,2-ortoéster de pentenilo **80**.

Buscando la diferenciación del hidroxilo primario en C-5, decidimos emplear un grupo protector de tipo silil éter¹³⁷ centrándonos en los más habituales y voluminosos como el tertbutildimetilsililo (TBDMS)¹³⁸ y el tertbutildifenilsililo (TBDPS)¹³⁹. Estos grupos, según la experiencia previa del grupo, eran estables en las condiciones de glicosidación de NPOEs, se pueden introducir y eliminar en condiciones suaves y de manera regioselectiva, y por tanto constituían una buena alternativa como grupo protector para C5-OH, y a su vez ortogonal a la función benzoato en C-2' que se originará tras la

¹³⁴ Gan to kagaku ryoho. *Cancer & chemotherapy*, **1987**, 14, 2251-2256.

¹³⁵ Alargov, D. K.; Naydenova, Z.; Grancharov, K.; Denkova, P. S.; Golovinsky, E. V. *Monatsh. Chem.*, **1997**, 128, 725-760.

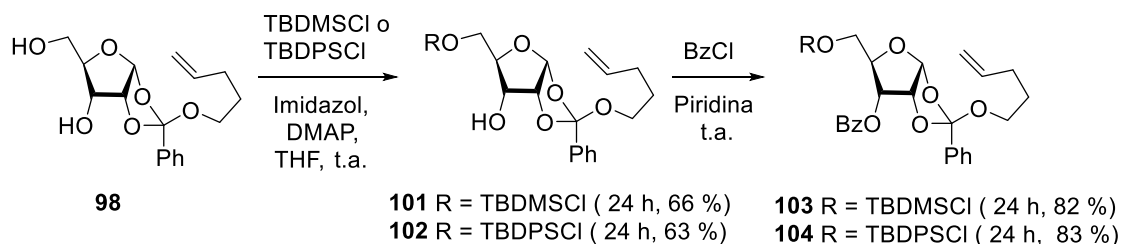
¹³⁶ Ghosh, M.; Miller, M. J. *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 3, 1519-1525.

¹³⁷ Hwu, R. J. R.; Tsay, S. C.; Cheng, B. L. *Chemistry of Organic Silicon Compounds*, Vol 2, Rappoport, Z; Apeloig, Y. Eds.; Wiley: New York, **1998**; p 431.

¹³⁸ Corey, E. J, Venkateswarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6190-6191.

¹³⁹ Hanessian, S.; Lavalley, P.; *Can. J. Chem.*, **1975**, 53, 2975-2977.

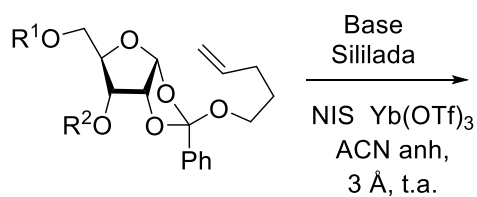
reacción de *N*-glicosidación.¹⁴⁰ Con esta idea, los ortoésteres **101** y **102** fueron preparados con buen rendimiento por tratamiento de una disolución del diol **98** en tetrahidrofurano (THF) con cloruro de tert-butildimetilsililo o tert-butildifenilsililo, respectivamente, en presencia de imidazol (Esquema 32). A partir del ortoéster **101**, se llevó a cabo la benzoilación con cloruro de benzoilo y piridina para dar lugar al compuesto **103**, que será empleado como nuevo dador de glicosilo frente a las nucleobases.



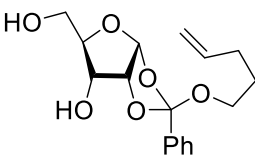
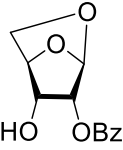
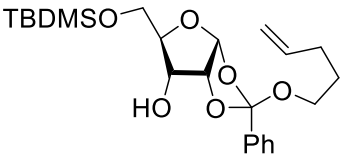
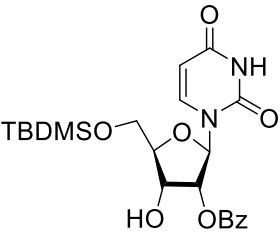
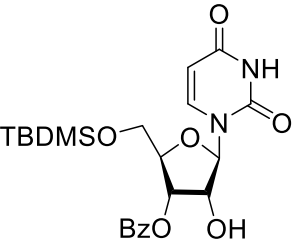
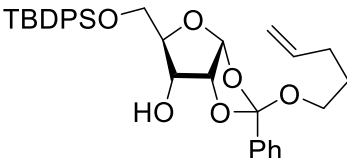
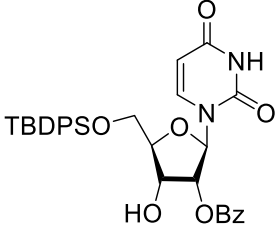
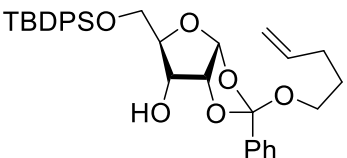
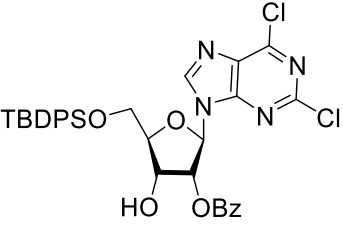
Esquema 32. Secuencia sililación-benzoilación del diol **98**.

Con todos estos nuevos dadores de glicosilo, se ensayó la reacción de *N*-glicosidación en las condiciones comentadas previamente para el ortoéster dibenzoilado **80**. Los resultados se recogen en la Tabla 6.

¹⁴⁰ Ágoston, K.; Streicher, H.; Fügedi, P.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2016**, 27, 707-728.

Tabla 6. Reacción de *N*-glicosidación de ortoésteres de pentenilo.R¹= H, Bn, Val-Fmoc, TBDMS, TBDPSR²= H, Bn, Val-Fmoc, Bz

Entrada ^a	Base	NPOE	Nucleósido	t (h)	Rto (%)
1	3	<p>99</p>	<p>104</p>	2	90
2	3	<p>100</p>	<p>105</p>	3	83
3	3	<p>103</p>	<p>106</p>	12	92
4	2	<p>103</p>	<p>107</p>	12	75

5	3	 98	 108	24	42
6	3	 101	 109	12	61
			 110		20
7	3	 102	 111	3	61
8	90	 102	 112	3	81

^a La reacción se lleva a cabo con 1 equivalente de NPOE y 2 equivalentes de base sililada en presencia de 1.3 equivalentes de NIS, 0.2 equivalentes de Yb(OTf)₃ y tamices moleculares 3Å en ACN anhidro, a temperatura ambiente.

Según los resultados expuestos en la Tabla 6, la reacción es compatible con NPOEs con grupos protectores tales como bencilo (**99**), ésteres de valina (**100**) y silileteres (**101-103**).

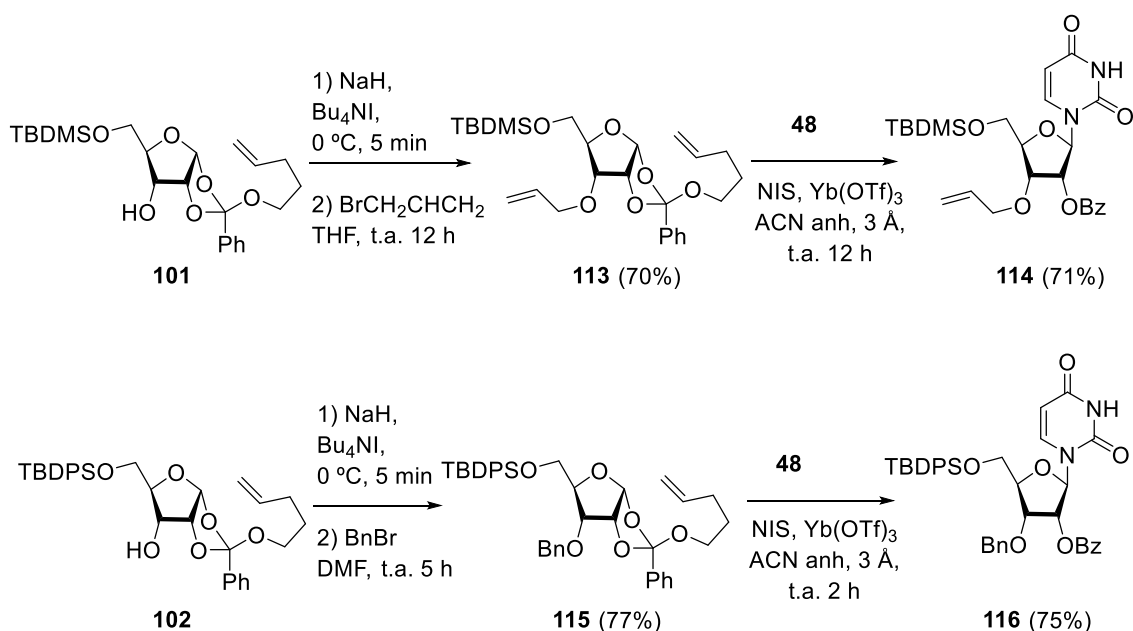
Aunque la mayoría de los acoplamientos se han realizado con uracilo, no hay diferencias significativas en cuanto a rendimiento al modificar la nucleobase (Tabla 6, comparar entradas 7 y 8).

Como cabía prever en función del concepto de donadores de glicosilo armados-desarmados, se pudo apreciar una mayor reactividad del ortoéster bencilado **99** (Tabla 6, entrada 1) comparado con el resto de ortoésteres sintetizados, requiriendo el primero únicamente dos horas de reacción para generar el nucleósido buscado con un 90% de rendimiento. El resto de ortoésteres (Tabla 6, entradas 2-9) requieren periodos más largos de reacción para lograr una total conversión.

La reacción no es aplicable a ortoésteres con el hidroxilo primario libre (Tabla 6, entrada 6), dado que al someter **98** a las condiciones habituales de reacción se produce exclusivamente el derivado 1,5 anhidro **108**, formado por una reacción de O-glicosidación intramolecular con el hidroxilo de C-5.

Por el contrario, la reacción transcurre con éxito en presencia del hidroxilo sobre C-3 libre (Tabla 6, entradas 6, 7 y 8) originándose buenos rendimientos de los correspondientes productos de acoplamiento. Este resultado pone de manifiesto que a pesar de la baja nucleofilia de las bases nitrogenadas, su reactividad sigue siendo superior a la de las funciones hidroxilo. No existe por tanto competencia entre O- y N-glicosidación, y no se detecta en ningún caso producto de autoglicosidación del ortoéster con el hidroxilo libre. Sin embargo, si es necesario reseñar que cuando la reacción se lleva a cabo con el ortoéster **101** (Tabla 6, entrada 6) (que posee un grupo tertbutildimetilsililo en O-5) además de observarse el producto de acoplamiento correspondiente **109** se aisló también el producto **110** originado por una transposición del grupo benzoilo de OH-2 a OH-3. A pesar de su similitud estructural, esta transposición no se observa cuando la reacción se realiza con el tertbutildifenilsilil análogo **102**.

Una vez demostrada la generalidad de la reacción de N-glicosidación con los ortoésteres de pentenilo, independientemente de los grupos protectores presentes en el donador de glicosilo, procedimos a la preparación de nucleósidos con las tres funciones hidroxilo diferenciadas. Como ya se ha comentado, el disponer de este tipo de nucleósidos es crucial para la síntesis de oligonucleótidos de ARN.



Esquema 33. Modificación de ortoésteres **101** y **102** y su N-glicosidación.

Con esta finalidad, se trataron los 5-O-silil ortoésteres **101** y **102** con hidruro sódico y bromuro de bencilo o bromuro de alilo originándose los ortoésteres “armados” **113** y **115**, respectivamente (Esquema 33). Estos donadores fueron tratados en condiciones habituales de N-glicosidación con uracilo sililado **48** para originar los nucleósidos **114** y **116** con excelentes rendimientos. Los nucleósidos resultantes presentan la ventaja de que poseen no sólo grupos diferenciados en las funciones hidroxilo, sino grupos protectores ortogonales, es decir, grupos que podrán ser selectivamente desprotegidos en condiciones suaves y sin afectar al resto de grupos presentes en la molécula.

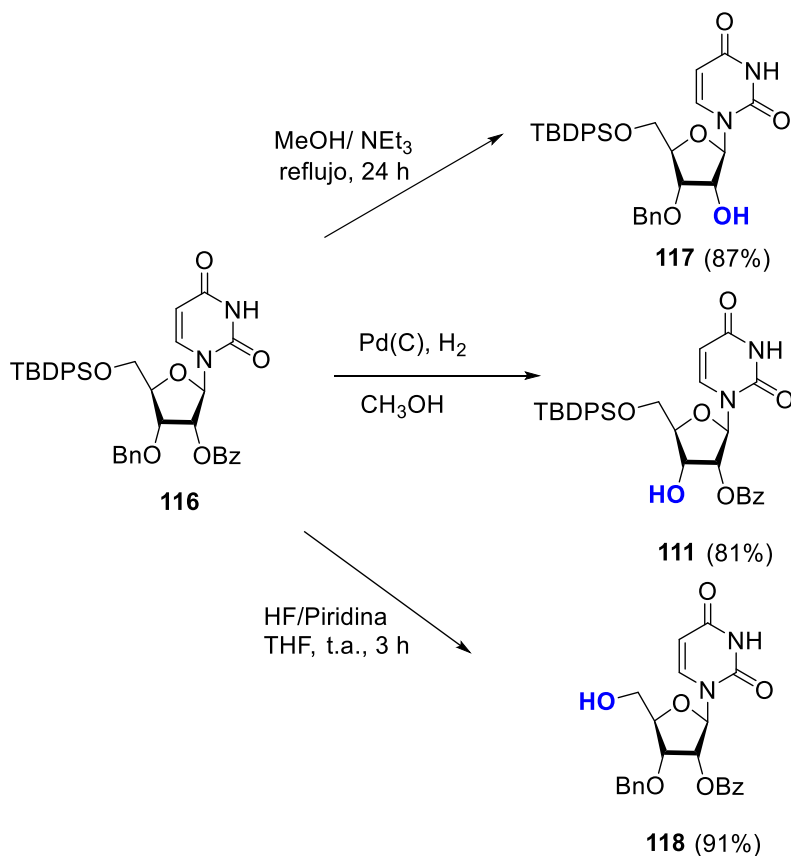
El término “ortogonal” en el contexto de “grupos protectores” fue introducido por Merrifield en el año 1977 en relación con la protección de funciones amino en la síntesis de péptidos,¹⁴¹ pero es en la química de carbohidratos, por el elevado número de grupos hidroxilo que contienen, donde ha encontrado su máxima utilidad.¹⁴²

Con el fin de demostrar la ortogonalidad de los grupos protectores seleccionados en el nucleósido **116**, la función benzoato fue saponificada bajo las condiciones de Zemplén para generar el 2'-OH-nucleósido **117** sin afectar a los otros dos grupos protectores (Esquema 34). Alternativamente, la hidrogenólisis del grupo bencilo generó el 3'-OH-nucleósido **111**. Finalmente el tratamiento con HF-Piridina condujo al 5'-OH-

¹⁴¹ Barany, G.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 7363–7365.

¹⁴² Ágoston, K.; Streicher, H.; Fügedi, P. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2016**, 27, 707–728.

nucleósido **118** (Esquema 34). Estos resultados ponen de manifiesto que, con la metodología empleada y los grupos protectores seleccionados, es posible obtener nucleósidos parcialmente protegidos con total regioselectividad.



Esquema 34. Desprotección Ortogonal

I.4.5 Aproximación a la síntesis de dinucleótidos basada en la reacción de *N*-glicosidación de ortoésteres de *n*-pentenilo.

Hasta este punto, se ha demostrado la utilidad de los ortoésteres de pentenilo como donadores de glicosilo frente a nucleobases en reacciones de *N*-glicosidación. Esta metodología ya nos había permitido la síntesis de nucleósidos perfectamente diferenciados con buenos rendimientos y selectividades. Con el fin de evaluar el alcance de la metodología desarrollada frente a sustratos de una mayor complejidad estructural nos planteamos su posible utilización en la síntesis de dinucleótidos, lo que implicaría la iteración de la reacción de *N*-glicosidación.

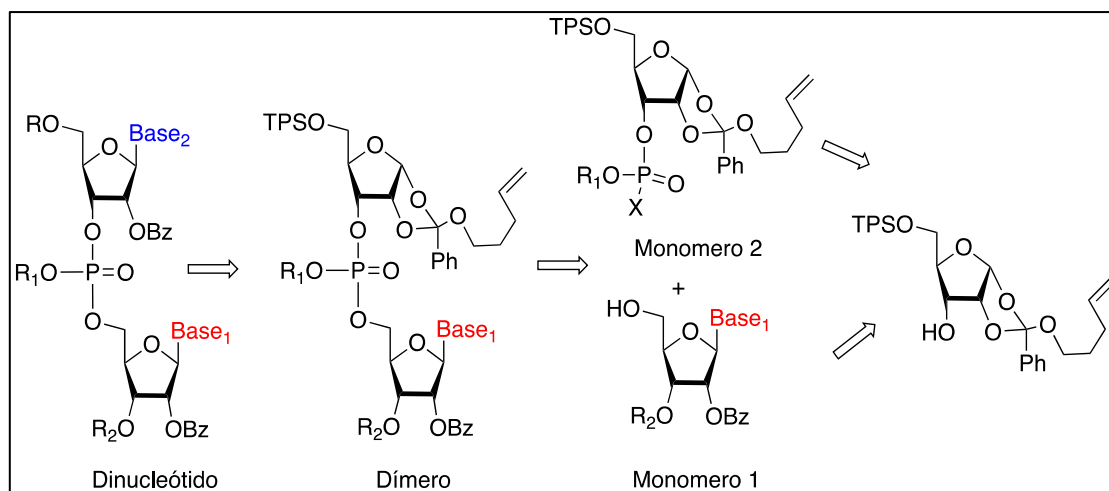


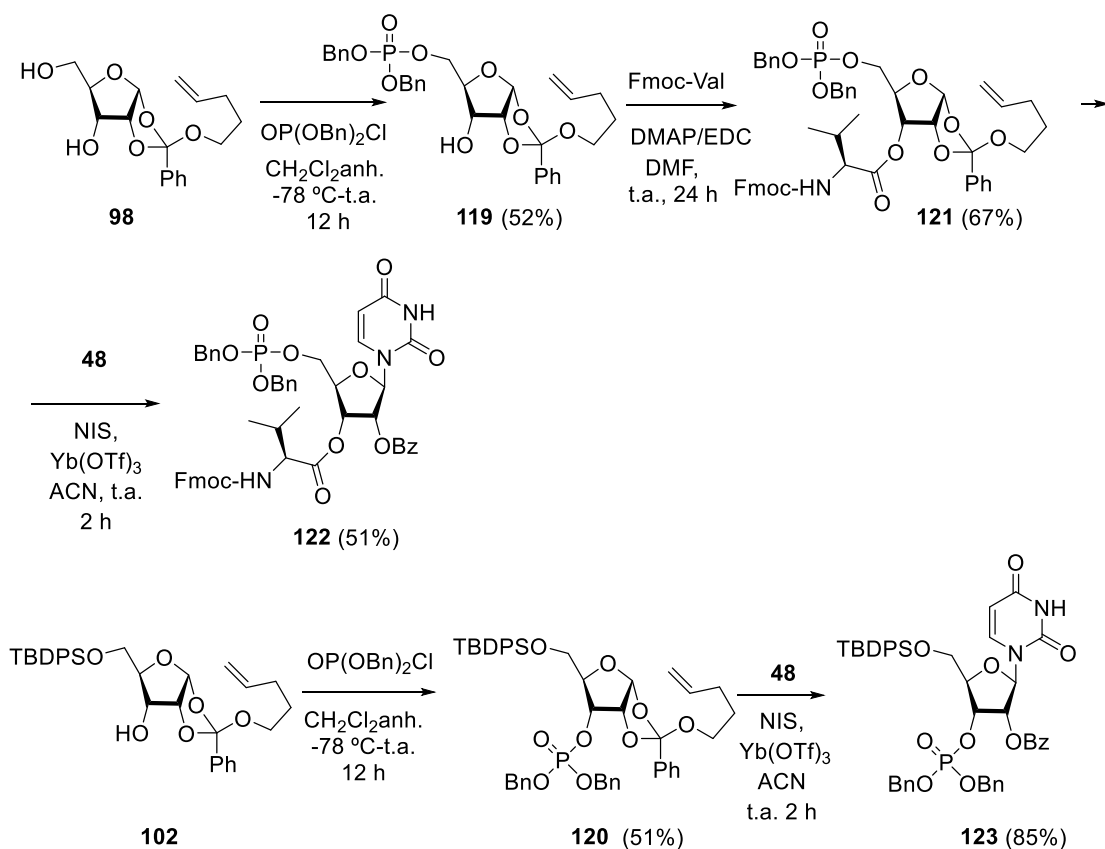
Figura 12. Aproximación a la síntesis de dinucleótidos

La estrategia planteada se muestra en la Figura 12. En una primera fase se llevará a cabo la reacción de *N*-glicosidación de un ortoéster de pentenilo sencillo con una base nitrogenada (base₁) para generar el monómero 1. El mismo ortoéster se modificará adecuadamente mediante la introducción de una función fosfato (o precursor del mismo) en el hidroxilo de C-3, constituyendo esta unidad el monómero 2. A continuación se realizará una reacción de acoplamiento entre ambas subunidades de ribosa (monómeros 1 y 2), que finalmente por una segunda reacción de *N*-glicosidación con una nueva base nitrogenada (base₂) originaría el dinucleótido buscado.

Esta estrategia presenta además la particularidad, que en caso de transcurrir con éxito, permitiría un crecimiento de la cadena por simple iteración del proceso. Por otro lado, aunque se había estudiado la compatibilidad de diferentes grupos protectores con las condiciones de reacción en las que se lleva a cabo la reacción de *N*-glicosidación, la aplicación de este planteamiento demanda el estudio de su compatibilidad con la funcionalidad fosfato.

En este contexto, y como estudios preliminares antes de abordar la síntesis de "dímero" decidimos sintetizar dos nuevos ortoésteres modelo que poseyeran la funcionalidad fosfato en su estructura (tanto sobre el hidroxilo en C-3 como en C-5). A partir de los ortoésteres **98** y **102**, por reacción con cloruro de dibencilfosforilo se accedió a los ortoésteres protegidos **119** y **120**, respectivamente (Esquema 35). El derivado **119** se trató a continuación con Fmoc-L-valina, EDC y DMAP en DMF para generar el derivado **121**. La reacción de los ortoésteres **121** y **120** con uracilo sililado **48** en presencia de Yb(OTf)₃ permitió obtener los nucleósidos deseados **122** y **123** con

rendimientos buenos o excelentes. Estos resultados demuestran la compatibilidad de las condiciones de glicosidación con la presencia de grupos fosfato.



Esquema 35. Síntesis de NPOE fosforilados y su reacción de N-glicosidación.

Teniendo en cuenta los objetivos anteriormente expuestos y considerando el éxito de la reacción en presencia de grupos fosfato, decidimos abordar la síntesis del “dímero” que contenía una unidad de ortoéster y otra de nucleósido. De entre todos los métodos químicos¹⁴³ investigados hasta la fecha (método del fosfodiéster,¹⁴⁴ método del fosfotriéster,¹⁴⁵ método del fosforamidito,¹⁴⁶ y método del fosfonato¹⁴⁷) para la formación del enlace internucleótido la química del fosforamidito se ha calificado hoy en día como la estrategia más eficaz. Esta consideración es consecuencia de la estabilidad de los reactivos y el alto rendimiento obtenido en el proceso, lo que ha permitido la

¹⁴³ Reese, C. B. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 3851–3868.

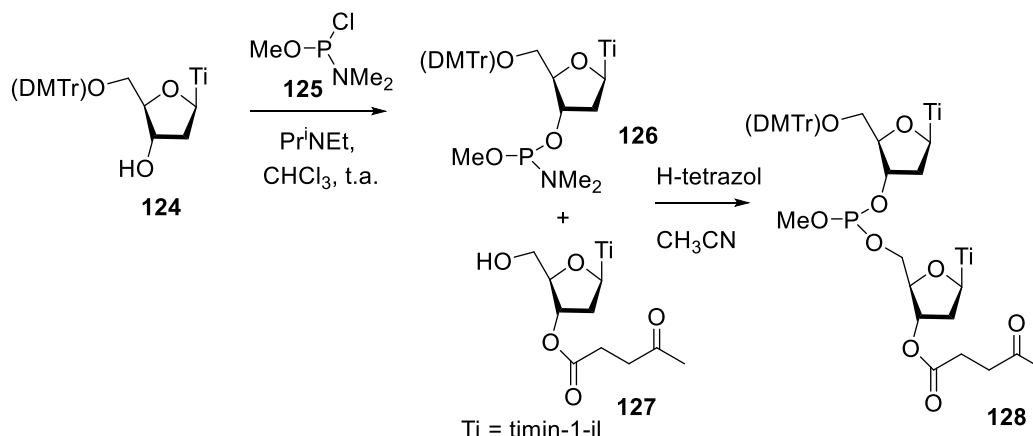
¹⁴⁴ Khorana, H. G. *Pure Appl. Chem.*, **1968**, 17, 349–381.

¹⁴⁵ Arentzen, R.; Reese, C. B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1977**, 445–460.

¹⁴⁶ Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 1859–1862.

¹⁴⁷ a) Garegg, P. J.; Lindl, I.; Regberg, T.; Stawinski J.; Strömberg, R. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4051–4054. b) Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 469–472. c) Froehler, B. C.; Ng, P. G.; Matteucci, M. D. *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 5399–5407. d) Froehler B. C. en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20, *Protocols for Oligonucleotides and Analogs*, ed. S. Agrawal, Humana, Totowa, **1993**, p. 63–80.

automatización de la síntesis. En su estudio original, Beaucage y Carutherstrataron el derivado de timina **124** con clorodimetilaminometoxifosfina **125** para originar el correspondiente fosforamidito **126** con un excelente rendimiento (Esquema 36).¹⁴⁸ Este derivado a su vez podía ser fácilmente activado por un promotor lográndose la condensación con una función hidroxilo de otro nucleósido de forma efectiva.



Esquema 36. Método del fosforamidito.

En cuanto a la protección del átomo de fósforo, aunque inicialmente se postuló el uso del grupo metilo,^{149,150,151} pronto se puso en evidencia que el grupo 2-cianoetilo^{152,153,154} presentaba una serie de ventajas adicionales que incluían su mayor estabilidad y, simultáneamente, la mayor facilidad con que se llevaba a cabo la desprotección (amoníaco acuoso) siendo compatible con la cadena de oligonucleótidos.^{153,154,155}

Al emplear el método del fosforamidito hay que incorporar una etapa adicional de oxidación del intermedio triesterfosfito al triesterfosfato, más estable, presente en el enlace internucleotídico. Generalmente, la oxidación es llevada a cabo por I₂ y el 10% de H₂O en presencia de una base.¹⁵⁶ El I₂ forma un complejo con el fósforo trivalente, y el agua presente en la reacción descompone el complejo dando como resultado el

¹⁴⁸ Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 1859–1862.

¹⁴⁹ Daub, G. W.; van Tamelen, E. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 3526–3528.

¹⁵⁰ Atkinson, T.; Smith, M. *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. Gait, M. J., Oxford: IRL Press. **1984**, 35–81.

¹⁵¹ Kumarev, V. P.; Kolocheva, T. I.; Motovilova, I. P.; Potemkin, G. A.; Sredin, Y. G. *Bioorganicheskaya Khimiya*, **1986**, 12, 1132–1134.

¹⁵² Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 3350–3355.

¹⁵³ Sinha, N. D.; Biernat, J.; McManus, J.; Köster, H. *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 4539–4557.

¹⁵⁴ Sinha, N. D.; Biernat, J.; Köster, H. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 5843–5846.

¹⁵⁵ Scaringe, S. A.; Francklyn, C.; Usman, N. *Nucleic Acids Res.*, **1990**, 18, 5433–5431.

¹⁵⁶ Beaucage, S. L.; Bergstrom, D. E.; Glick, G. D.; Jones, R. A. *In Current protocols in nucleic acid chemistry*, NY, **2001**; capítulo 3.

fosfato triéster.

I.4.5.1. Reacción de acoplamiento entre un nucleósido y un ortoéster de pentenilo vía fosforamidito

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se pasó a efectuar la síntesis del “dímero” mediante el empleo del método del fosforamidito (Figura 13). La estrategia, como se muestra en la Figura 13, se basa en el acoplamiento entre el grupo 5-OH del ribonucleósido, cuya síntesis ya ha sido comentada anteriormente, (monómero 1) y el grupo 3-O-fosforamidito del 1,2-ortoéster de pentenilo (monómero 2)

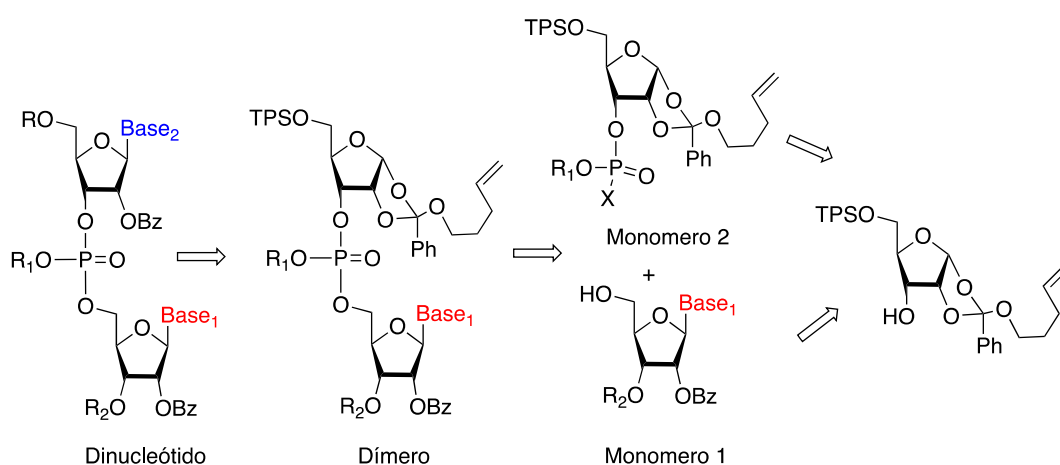
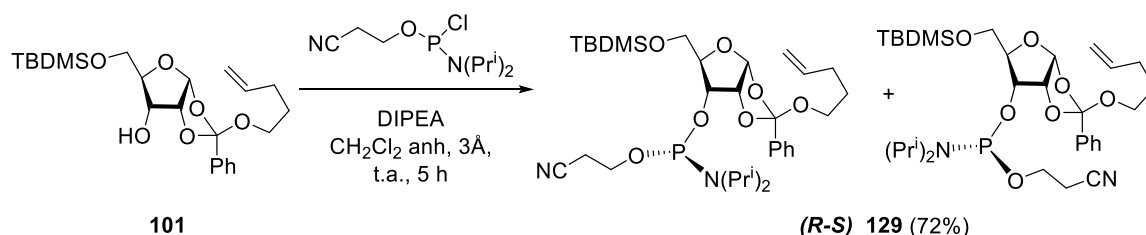


Figura 13. Esquema retrosintético propuesto para la síntesis de dinucleótidos.

Así, para la síntesis de la unidad portadora del fosforamidito **129**, se parte del ortoéster **101** y se trata con 2-cianoetoxi-N,N-diisopropilaminoclorofosfina en CH_2Cl_2 anhidro y empleando N,N-diisopropiletilamina como base (Esquema 37). La reacción transcurre vía ataque nucleófilo del O-3 del ortoéster a la fosfina. El producto resultante se obtiene como una mezcla de ambos diastereoisómeros en el fósforo.¹⁵⁷ En los primeros ensayos, el compuesto **129** fue obtenido con rendimientos moderados (36-43%), probablemente debido a la baja estabilidad de la clorofosfina y problemas relacionados con la formación del hidrocloreuro de la amina. De acuerdo con esto, una mejora sustancial del rendimiento (72%) se obtuvo al llevar a cabo la reacción en presencia de tamices moleculares (3 Å) recién activados e incorporando un 2% de NEt_3 en la mezcla de elución para la purificación del residuo. El derivado **129** es un compuesto lábil que tiene que ser almacenado a baja temperatura y debe ser empleado en un tiempo inferior a un mes desde su preparación.

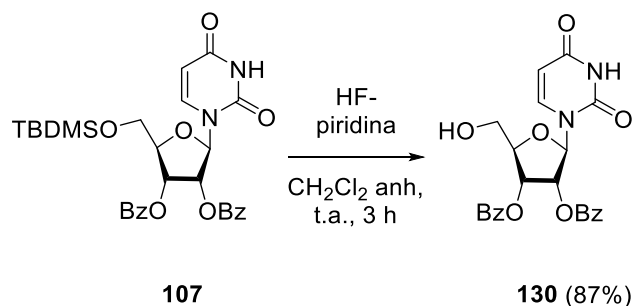
¹⁵⁷ Lesnikowski, Z. J.; Sibinska, A. *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 5025-5034.



Esquema 37. Síntesis de los ortoésteres fosforamidito diastereoméricos, **129**.

La determinación estructural del fosforamidito **129** se realizó en base a sus datos analíticos y espectroscópicos. Estos análisis requieren una precaución especial en la preparación de la muestra para evitar la hidrólisis del fosforamidito. En nuestro caso se empleó con éxito el uso de CDCl_3 filtrado a través de alúmina básica para eliminar el agua y las trazas de ácido. Se observa en los espectros de ^1H -RMN la aparición de dos nuevas señales a 1.18 y 1.20 ppm que se asignó a los grupos CH_3 del resto de isopropilamina. Asimismo, se observó un desapantallamiento de la señal correspondiente al protón 3'-CH (de $\delta = 3.86$ ppm en **101** a $\delta = 4.07$ ppm en **129**). Los espectros de ^{31}P -RMN mostraron la aparición de dos nuevas señales a 8.28 y 8.04 ppm que fueron asignados a los dos diastereoisómeros del fosfito.

Por otra parte, la preparación de la unidad portadora del nucleósido, 5'-OH- β -ribouridina **130**, se realizó por desililación de **107** con el sistema HF-piridina (Esquema 38).



Esquema 38. Desililación del nucleósido **107**.

Una vez preparadas las dos unidades, se procedió a ensayar una variedad de promotores para su acoplamiento. Como primer promotor elegimos 1H-tetrazol, ya que se usa habitualmente en la síntesis de ADN y también ha sido empleado con éxito en la síntesis de oligómeros de ARN.¹⁵⁸ El 1H-tetrazol tiene una acidez lo suficientemente alta ($\text{pK}_a = 4.8$, H_2O) para permitir la protonación de distintos tipos de fosforamidito y tiene

¹⁵⁸ Gryaznov, S. M.; Winter, H. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 4160-4167.

una solubilidad adecuada en acetonitrilo, medio en el que es soluble el nucleósido (La solubilidad se sitúa en el entorno de 0.5 M, por lo que se emplea en concentraciones de 0.45 M para evitar la precipitación).¹⁵⁹

El mecanismo propuesto para la reacción de acoplamiento se muestra en la Figura 13 e implica tres etapas: a) un primer paso rápido de protonación del grupo amino del fosforamidito; b) formación del intermedio fosforotetrazolio por un posterior ataque nucleofílico del ion tetrazolio generado en la primera etapa; y c) reacción de este intermedio con el hidróxido libre del nucleósido para originar el correspondiente fosfito triéster con regeneración del tetrazol.

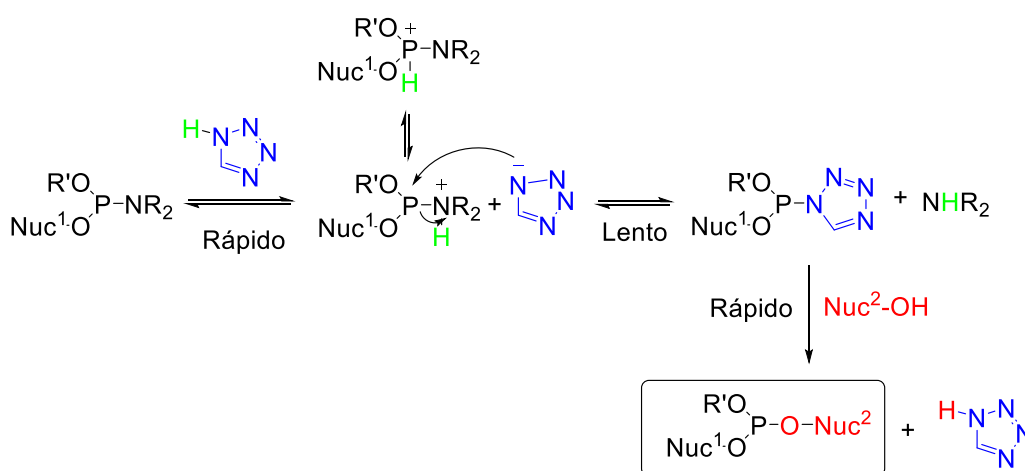
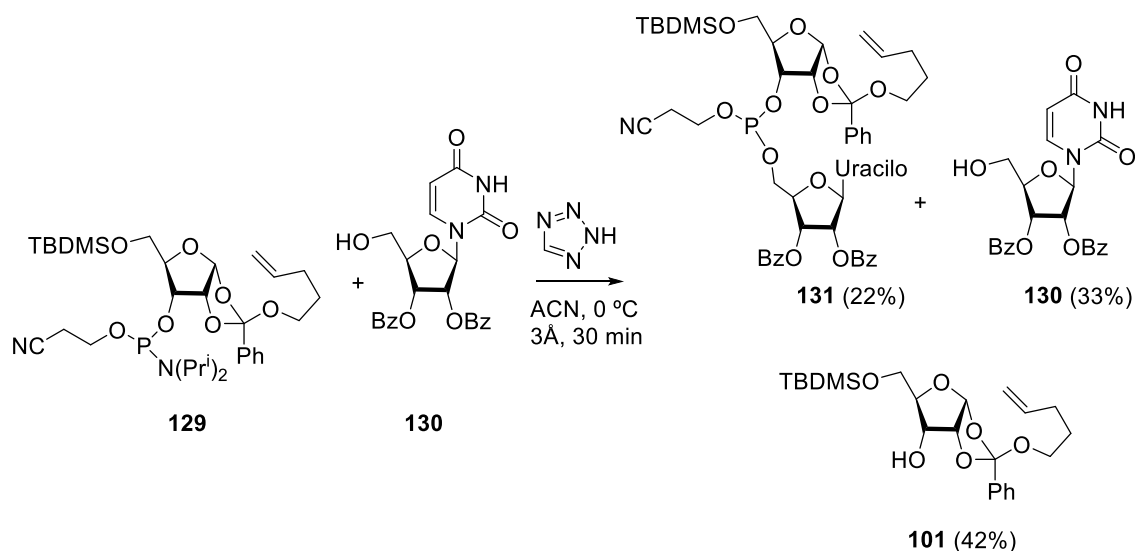


Figura 13. Mecanismo de acoplamiento mediado por 1H-tetrazol

Así, en un primer ensayo, la reacción de acoplamiento catalizada por tetrazol se realizó a 0 °C en acetonitrilo anhidro bajo atmósfera de argón empleando un exceso de fosforamidito **129** (1.5 equivalentes) ya que es conocida la susceptibilidad de este tipo de sustratos frente a la hidrólisis. Sin embargo, tras 18 h de reacción no fue posible detectar nada del producto de acoplamiento. Por otro lado, cuando la reacción se realizó en presencia de tamices moleculares activados, se logró aislar el “dímero” deseado **131** con un 22% de rendimiento, aunque también se observa la recuperación del alcohol **101** con un 42%, producto obtenido por hidrólisis del fosforamidito **129** (Esquema 39).

¹⁵⁹ Wolter, A.; Leuck, M. U.S. Patent 0,247,431, **2006**.



Esquema 39. Formación del enlace fosfotriéster

En vista de que los resultados en la reacción de acoplamiento con tetrazol no habían sido demasiado satisfactorios, decidimos ensayar otros promotores que en la literatura se habían descrito como más reactivos. Estos promotores habían demostrado su utilidad en la síntesis de ARN^{160,161} y eran compatibles con fosforamiditos impedidos estéricamente y poco reactivos.¹⁶² Se seleccionaron inicialmente tetrazoles más ácidos (lo que facilitaría la primera etapa de la reacción de acoplamiento) incluyendo el el 5-benciltio-1H-tetrazol (BTT), con un pKa de 4.08¹⁶³ y con una solubilidad en acetonitrilo de 0.44 M¹⁶⁴ y, el 5-(etiltio)-1H-tetrazol (ETT) con un pKa de 4.3^{165,166} pero con una solubilidad en acetonitrilo bastante superior (1.52 M)¹⁶⁷. Alternativamente se escogieron también activadores de mayor nucleofilia (que favoreciesen la segunda etapa de la reacción de acoplamiento) aunque presentasen una acidez similar o menor que el tetrazol. Ejemplos representativos de este segundo grupo serían 4,5-dicianoimidazol (DCI),^{168,169} y triflato de bencimidazol (BIT),¹⁷⁰ con unas solubilidades en acetonitrilo de 1.1 M¹⁷¹ y 0.4 M¹⁷², respectivamente.

¹⁶⁰ Sproat, B.; Colonna, F.; Mullah, B.; Tsou, D.; Andrus, A.; Hampel, A.; Vinayak, R. *Nucleosides and Nucleotides*, **1995**, *14*, 255-273.

¹⁶¹ Tsou, D.; Hampel, A.; Andrus, A.; Vinayak, R. *Nucleosides and Nucleotides*, **1995**, *14*, 1481-1492.

¹⁶² Dahl, B.H.; Nielsen, J.; Dahl, O. *Nucleic Acids Res.*, **1987**, *15*, 1729-1743.

¹⁶³ Welz, R.; Muller, S. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 795-797.

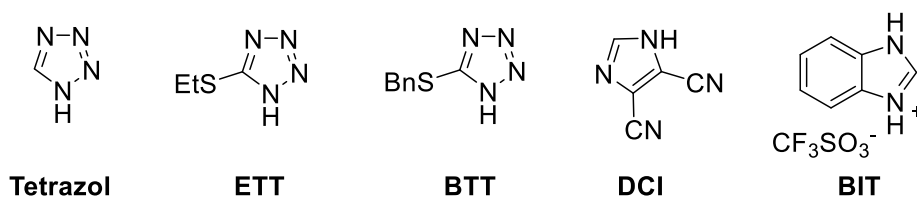
¹⁶⁴ Wolter, A.; Leuck, M. U.S. Patent 0,247,431, **2006**.

¹⁶⁵ Threlfall, R. N.; Torres, A. G.; Krivenko, A.; Gait, M. J.; Caruthers, M. H. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 746-754.

¹⁶⁶ Wincott, F.; DiRenzo, A.; Shaffer, C.; Grimm, S.; Tracz, D.; Workman, C.; Sweedler, D.; Gonzalez, C.; Scaringe, S.; Usman, N. *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 2677-2684.

¹⁶⁷ Wolter, A.; Leuck, M. U.S. Patent 0,247,431, **2006**.

¹⁶⁸ Rao, M. V.; Reese, C. B.; Schehlmann, V.; Yu, P. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 43-55.

**Figura 14.** Estructura de agentes de acoplamiento

Los resultados obtenidos en nuestro sistema con cada uno de estos promotores se encuentran recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Empleo de diferentes promotores en la reacción de **129** con **130**.

Entrada ^a	129 (eq)	Promotor (eq.)	pKa promotor	T	t (min)	Rto. 131 (%)	Rto. 101 (%)
1	1.5	1H-Tetrazol (2 eq.)	4.80	0 °C	30	22	42
2	1.5	ETT (2 eq.)	4.30	t.a.	60	3	37
3	1.5	BTT (2 eq.)	4.08	t.a.	30	5	43
4	2	DCI (4.5 eq.)	5.20	0 °C	10	52	-
5	1	BIT (1.5 eq.)	4.50	t.a.	3	80	-

^a La reacción se lleva a cabo con 1 equivalente del 5'-OH-nucleósido **130** y fosforamidito **129** en presencia de promotor y tamices moleculares 3Å previamente activados en ACN anhidro 0.45M.

A la vista de los datos reflejados en la Tabla 7 se puede destacar los siguientes puntos:

La acidez y la nucleófilia del promotor influyen de manera decisiva en la formación del producto de acoplamiento. Los promotores habitualmente utilizados como el 1H-tetrazol, ETT, BTT, condujeron al producto de acoplamiento **131** aunque en muy bajo rendimiento junto con el ribonucleósido de partida **130** y el 3'-OH-NPOE **101** resultante de la pérdida del grupo fosforamidito del NPOE **129** (Tabla 7, entradas 1-3).

¹⁶⁹ Threlfall, R. N.; Torres, A. G.; Krivenko, A.; Gait, M. J.; Caruthers, M. H. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 746-754.

¹⁷⁰ Hayakawa, Y.; Kataoka, M., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12395-12401.

¹⁷¹ Vargeese, C.; Carter, J.; Yegge, J.; Krivjansky, S.; Settle, A.; Kropp, E.; Peterson, K.; Pieken, W. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 1046-1050.

¹⁷² Hayakawa, Y.; Kawai, R.; Hirata, A.; Sugimoto, J.; Kataoka, M.; Sakakura, A.; Hirose, M.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 8165-8176.

La utilización de un promotor menos ácido pero más nucleófilo como el dicianoimidazol (DCI) (Tabla 7, entrada 4) mejora significativamente el rendimiento del producto de acoplamiento, respecto al uso promotores más ácidos (Tabla 7, comparar entradas 3 y 4). Por último, con el empleo de un promotor que tiene la capacidad para equilibrar la acidez y la nucleofilia como es el triflato de bencilimidazol (BIT), se pudo obtener el producto de acoplamiento deseado, **131**, con buenos rendimientos y sin la presencia de productos secundarios (Tabla 7, entrada 5).

La estructura del compuesto **131** se confirmó mediante el análisis de los espectros de ^1H , ^{13}C -RMN y su espectro de masas. En el espectro de ^1H RMN del producto de acoplamiento **131** se observa la desaparición de las señales características de los protones debido a los metilos de la isopropilamina y, al mismo tiempo, se observa el desplazamiento a bajo campo de las señales correspondientes a los protones $5'\text{-CH}_2$ del nucleósido, debido al efecto desapantallante del átomo de fósforo. Además, en el espectro de ^{31}P -RMN del compuesto de acoplamiento se pueden observar dos señales singletes correspondientes a los dos diastereoisómeros en la zona 139.89 y 139.34 ppm características de un enlace fosfito triéster y bien diferenciadas de las que se presentaban en los fosforamiditos de partida (8.28 y 8.04 ppm).

Hay que mencionar que, debido a la inestabilidad del enlace fosfito triéster y del ortoéster a los medios ácidos, se hace necesario que los eluyentes empleados en las purificaciones cromatográficas contengan una pequeña cantidad de NEt_3 (2%).

I.4.5.2 Reacción de Oxidación

La siguiente etapa del ciclo de síntesis de oligonucleótidos de ARN es la oxidación del intermedio fosfito triéster al correspondiente fosfato. Al contrario que en el caso de la reacción de acoplamiento donde se han investigado una amplia variedad de promotores, para la reacción de oxidación se han descrito pocos métodos efectivos.

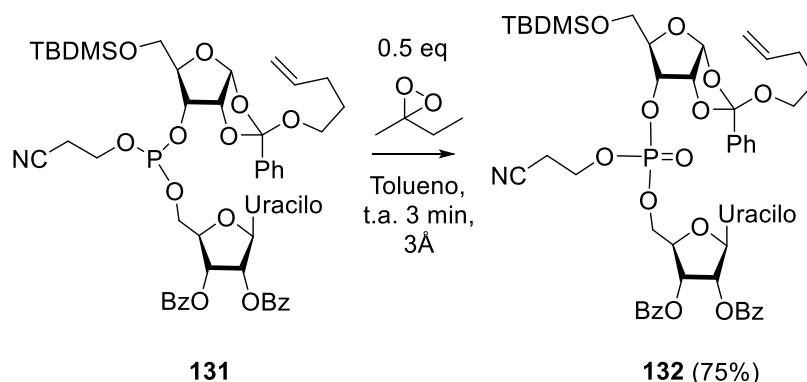
El reactivo más habitualmente empleado para la síntesis de oligoribonucleótidos es el I_2 en piridina acuosa,¹⁷³ pero dada la presencia de un doble enlace en el ortoéster de pentenilo que fácilmente podría experimentar reacciones de adición del ión yodonio, se consideró más adecuado emplear el etil(metil)dioxirano (peróxido de 2-butanona),¹⁷⁴

¹⁷³ Beaucage, S. L.; Bergstrom D. E.; Glick, G. D.; Jones, R. A. *In Current protocols in nucleic acid chemistry*, NY, **2001**; capítulo 3.

¹⁷⁴ Kataoka, M.; Hattori, A.; Okino, S.; Hyodo, M.; Asano, M.; Kawai R.; Hayakawa, Y. *Org. Lett.*, **2001**, 3, 815-818.

que es un reactivo disponible comercialmente y que permite llevar a cabo la reacción en condiciones anhidras. La reacción se realizó en tolueno y en presencia de tamices moleculares bajo atmósfera inerte, obteniéndose el fosfato correspondiente **132** con un 75% (Esquema 40).

La elucidación de la estructura de **132** se llevó a cabo mediante técnicas de RMN. Si bien los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN permiten observar señales compatibles con la estructura deseada, no se percibe ninguna prueba inequívoca de la estructura propuesta. La evidencia definitiva la obtenemos de la observación del espectro de ^{31}P -RMN en el se aprecia la desaparición de las dos señales a 139.89 y 139.34 ppm correspondientes a los dos isómeros del fosfito triéster **131** y la aparición de dos nuevas señales a: -1.33 y -1.69 ppm que se asignaron a los dos estereoisómeros del fosfato triéster **132**.



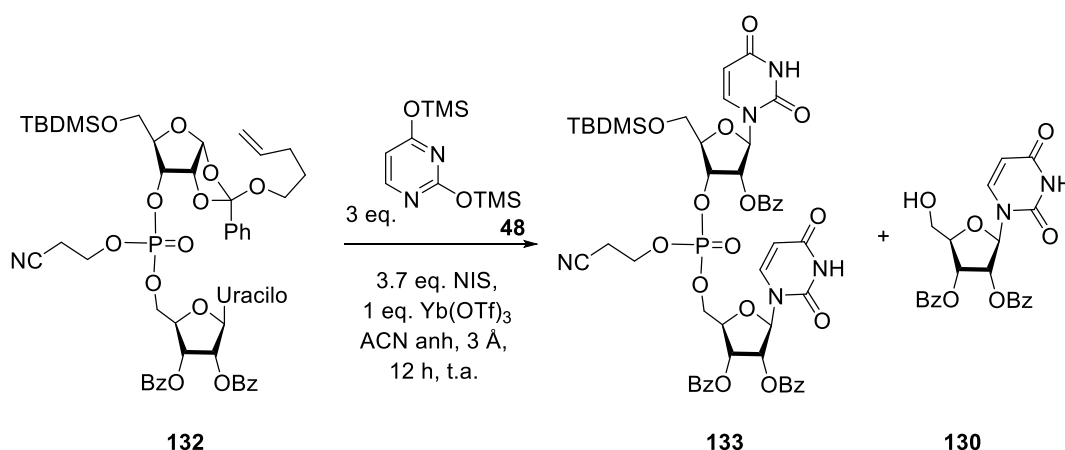
Esquema 40. Reacción de oxidación del fosfito.

I.4.5.3 Reacción de *N*-glicosidación

A continuación, se estudió la viabilidad de la reacción de *N*-glicosidación en el fosfato triéster **132**. Comenzamos estudiando la reacción de glicosidación con uracilo y aplicando las condiciones más generales ya comentadas anteriormente en esta memoria y que implicaban el uso de 0.2 equiv. de $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ y 1.2 equiv. de NIS. Sin embargo, en estas condiciones no se observó reacción y se recuperó el material de partida inalterado, incluso tras largos tiempos de reacción (hasta 4 días de reacción). Análogos resultados se obtuvieron al emplear la citosina siliada como aceptor.

Ensayos posteriores elevando la cantidad de NIS y de $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (hasta 3.7 y 1 equivalentes, respectivamente) llevaron a observar la total desaparición del material de partida (Esquema 41). En estas condiciones de reacción se obtenía un crudo complejo

de reacción en el que por cromatografía en capa fina se apreciaba la formación de una gran cantidad de productos. La purificación cromatográfica de este crudo llevó al aislamiento de tres fracciones diferentes. En la primera de ellas se consiguió identificar la presencia del 5'OH-ribonucleósido **130**, que sugiere la fragmentación del dímero inicial y sin que se observen señales atribuibles a la porción del ortoéster del dímero inicial. En una segunda fracción se observan productos que si bien conservan las dos porciones del dímero, carece de las señales características del cianoetilo unido al fosfato. El espectro de ^1H -RMN de la tercera y última fracción si parece sugerir la presencia del dinucleótido, lo que se corrobora por la observación del espectro de masas adquirido en modo positivo y por técnica de electroespray (se detecta un pico correspondiente $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 1031 unidades de masa). Sin embargo, dada la pequeña cantidad de producto obtenido no fue posible la obtención de todos los datos requeridos para su caracterización inequívoca.

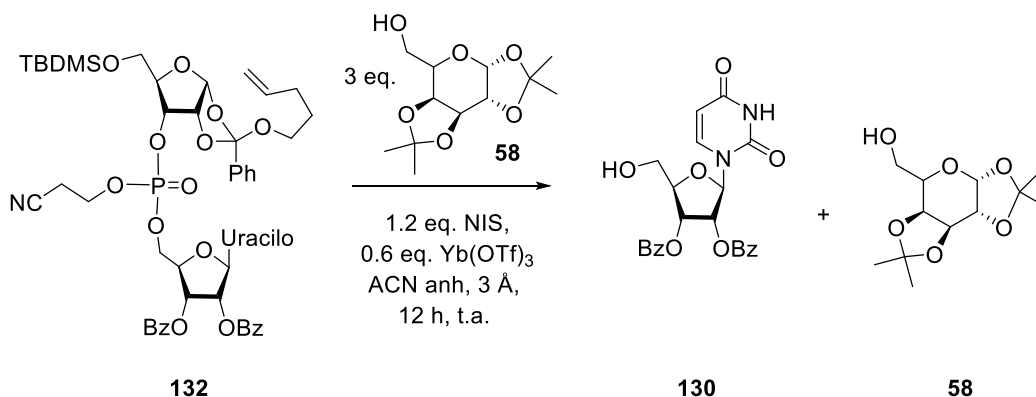


Esquema 41. Reacción N-glicosidación para la síntesis del dinucleótido **133**.

Estos resultados obtenidos, parecen indicar que si bien, la reacción de *N*-glicosidación tiene lugar en una determinada extensión, el enlace internucleótido no es demasiado estable a las condiciones en las que se lleva a cabo el acoplamiento.

Para tener unas evidencias más claras de la situación, decidimos ensayar sobre el mismo “dímero” una reacción de *O*-glicosidación empleando como aceptor un alcohol, mucho más fácil de llevar a cabo desde un punto de vista experimental. Con esta idea, se ensayó la reacción de **132** empleando como aceptor de glicosilo 1,2,3,4-diisopropiliden- α -D-galactopiranososa **58**, y como promotor el mismo sistema, NIS/ $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, que se ha estado empleando a lo largo de la memoria para la síntesis de nucleósidos (Esquema 42). Comenzamos trabajando a 0 °C y lo que se pudo observar fue la desaparición del dímero de partida pero con recuperación casi total del azúcar

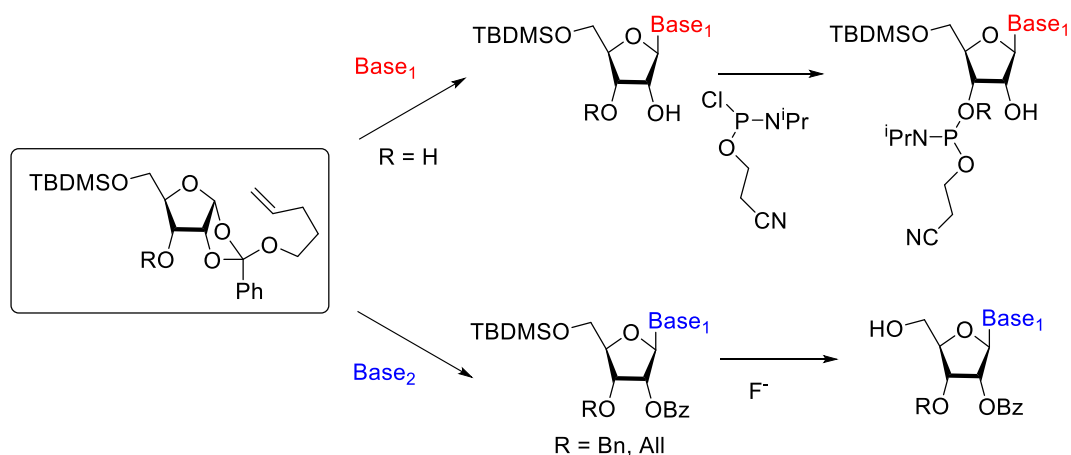
aceptor. Además de nuevo se aísla el 5'-OH-ribonucleósido **130** confirmándonos de nuevo, la labilidad del enlace fosfotriéster que une las dos unidades del “dímero”.



Esquema 42. Reacción de glicosidación con diacetonalactosa.

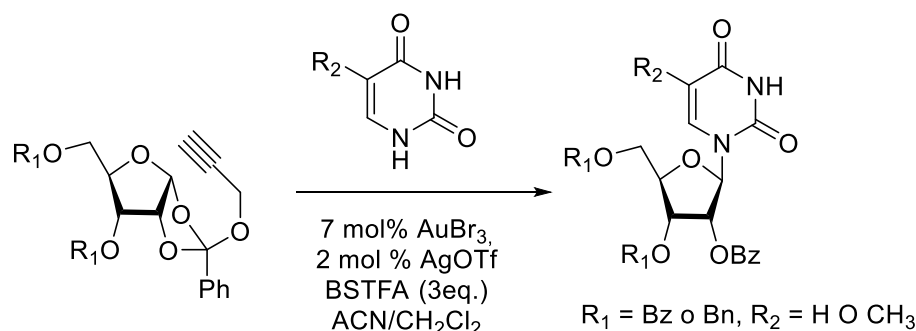
En base a los resultados obtenidos, concluimos que la funcionalidad de fosfato triéster “real” y requerida para construir la unión entre dos nucleótidos no es compatible con las condiciones de glicosidación que han sido desarrolladas para la síntesis de nucleósidos. Si se desea emplear esta metodología, la construcción de todos y cada uno de los nucleósidos debe ser previa a la formación del enlace internucleótido.

A pesar de ello la utilización de ortoésteres, en nuestro caso de pentenilo, presenta la ventaja indiscutible frente a otros donadores de glicosilo de la diferenciación de todos los grupos hidroxilos, lo que proporciona con buenos rendimientos unidades de nucleósidos que pueden ser incorporados en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (Esquema 43).



Esquema 43

En este punto, debe mencionarse que cuando ya habíamos iniciado estos estudios, apareció un trabajo de Hotha y colaboradores¹⁷⁵ muy relacionado con el abordado en esta tesis doctoral y en el que describía la utilización de los 1,2-ortoésteres de propargilo¹⁷⁶ como materiales de partida para la síntesis de nucleósidos pirimidínicos (Esquema 44).



Esquema 44. 1,2-Ortoésteres de propargilo en la síntesis de nucleósidos de pirimidina.

La activación de estos ortoésteres se realiza en presencia de cantidades catalíticas de sales de Au(III) y el método había sido previamente empleado para la preparación de glicomiméticos,¹⁷⁷ glicopolímeros,¹⁷⁸ glicoconjugados,¹⁷⁹ y oligosacáridos.¹⁸⁰ En su caso, la reacción de *N*-glicosidación se lleva a cabo en una mezcla de acetonitrilo/cloruro de metileno y empleando como agente sililante de las bases *N*,*O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida. Bajo la catálisis de AuBr₃ y AgOTf obtienen rendimientos que oscilan entre el 70 y el 85% al emplear bases pirimidínicas. Sin embargo, los autores ponen de manifiesto que el método no es válido para bases púricas.

¹⁷⁵ Rao, B. V.; Manmode, S.; Hotha, S. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 1499–1505.

¹⁷⁶ Sureshkumar, G.; Hotha, S. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 6564–6568.

¹⁷⁷ a) Vidadala, S. R.; Pimpalpal, T. M.; Linker, T.; Hotha, S. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 2426–2430. b) Pimpalpal, T. M.; Vidadala, S. R.; Hotha, S.; Linker, T. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 10434–10436.

¹⁷⁸ a) Thadke, S. A.; Kar, M.; Gupta, S. S.; Hotha, S. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1511–1518. b) Pati, D.; Shaikh, A. Y.; Das, S. K.; Nareddy, P. K.; Swamy, M. J.; Hotha, S.; Gupta, S. S. *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 1287–1295. c) Shaikh, A. Y.; Das, S.; Pati, D.; Dhaware, V.; Gupta, S. S.; Hotha, S. *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 3679–3686.

¹⁷⁹ Sureshkumar, G.; Hotha, S. *Glycoconjugate J.* **2012**, *29*, 221–230.

¹⁸⁰ a) Thadke, S. A.; Mishra, B.; Hotha, S. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 2466–2469. b) Thadke, S. A.; Mishra, B.; Hotha, S. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 7358–7371. c) Kayastha, A. K.; Hotha, S. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7161–7163. d) Thadke, S. A.; Hotha, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 9914–9920.

I.5. Conclusiones

En la Sección I de la Memoria, encaminada al desarrollo de nuevos métodos de síntesis de nucleósidos, se ha demostrado la viabilidad del empleo de 1,2 ortoésteres de pentenilo como donadores de glicosilo frente a nucleobases para la formación estereoselectiva de β -ribonucleósidos. La reacción de *N*-glicosidación transcurre con buenos rendimientos tanto para bases púricas como pirimidínicas.

Se ha demostrado además la compatibilidad del método con una variedad de grupos protectores en las funciones hidroxilo posibilitando la diferenciación y protección selectiva de los grupos hidroxilo C-2' y C-3'. La estrategia, sin embargo, no es compatible con el enlace fosfotriéster que une dos nucleósidos en los nucleótidos.

Las conclusiones fundamentales de esta sección de la Tesis se pueden resumir en los siguientes puntos

- Se ha desarrollado un método eficaz para la formación estereoselectiva de β -ribonucleósidos basada en el empleo de 1,2 ortoésteres de pentenilo como donadores de glicosilo empleando uracilo como nucleobase modelo. La reacción de *N*-glicosidación transcurre con rendimientos de excelentes a buenos
- La robustez de la metodología permite extrapolarla, no sólo a otras bases pirimidínicas, sino también a bases púricas, de mucha menor reactividad.
- Se ha demostrado la compatibilidad del método con diferentes grupos protectores en las funciones hidroxilo de la ribosa. La metodología es efectiva en presencia de los grupos protectores más habituales en química de carbohidratos y nucleósidos. Especialmente relevante es la posibilidad de emplear ortoésteres que contienen grupos hidroxilo libres.
- La estrategia presenta la ventaja indiscutible, frente a otros donadores de glicosilo, de que facilita la diferenciación de todos los grupos hidroxilos proporcionando buenos rendimientos de unidades de nucleósidos con grupos protectores ortogonales que pueden ser incorporados en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos
- Si bien la reacción de *N*-glicosidación es eficiente, la estrategia, no es compatible con el enlace fosfotriéster que une los nucleósidos en los nucleótidos naturales.

II. CAPÍTULO 2.

DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA SÍNTESIS DE SONDAS FLUORESCENTES CONJUGABLES

Relacionado con el estudio de las reacciones de *N*-glicosidación que ya han sido descritas en la sección anterior, comencé a colaborar en un proyecto encaminado a desarrollar metodologías sencillas de acceso a etiquetas o sondas fluorescentes que además de a nucleósidos, permitiesen su incorporación a otras moléculas de interés, tales como carbohidratos o péptidos. Este tema de trabajo estaba enmarcado en una colaboración ya establecida entre nuestro grupo de “*oligosacáridos y glicosistemas*” del IQOG-CSIC con el grupo de investigación del Prof. Peña-Cabrera de la Universidad de Guanajuato (México). Los resultados obtenidos como consecuencia de esta investigación son los que han originado el segundo gran bloque de trabajo descrito en esta Memoria de Tesis doctoral.

II.1 Introducción general

II.1.1 Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno físico que ha sido aprovechado en diferentes campos de la ciencia debido a la sensibilidad con la que puede ser detectada. Un ejemplo de ello es en el área de la Biología, en la cual el marcaje fluorescente de biomoléculas ha contribuido al conocimiento de los procesos celulares, así como de los mecanismos de enfermedad y su tratamiento. En esta sección de la Memoria se hablará del marcaje fluorescente empleando derivados de difluoroboro dipirrometenos (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) o BODIPYs; uno de los colorantes fluorescentes más versátiles existentes hasta el momento.

Los colorantes son compuestos orgánicos que contienen sistemas de dobles enlaces conjugados (cromóforos) que posibilitan la absorción de la radiación en la región visible del espectro electromagnético. Muchos de estos cromóforos emiten también fluorescencia cuando son estimulados con luz ultravioleta o láser, y se les denomina fluorocromos. En estos derivados la parte de la molécula responsable de la emisión de fluorescencia se denomina fluoróforo.

La fluorescencia es el proceso de emisión espontánea de un fotón por parte de una molécula excitada por la absorción de la radiación electromagnética. La absorción de radiación ocurre cuando un fotón incidente promueve la transición de un electrón desde su estado fundamental singlete, S_0 , a un estado singlete electrónicamente excitado, S_1 , para regresar al estado fundamental mediante distintos mecanismos que pueden ser radiativos o no radiativos. Estos últimos, incluyen la relajación vibracional (desactivación del estado excitado, desde un nivel vibracional superior al inferior del correspondiente estado electrónico), la conversión interna (desactivación desde un estado electrónico superior al inferior), y el cruce inter-sistema singlete-triplete. Por otro lado, entre los procesos de relajación radiativos destacan la fluorescencia y la fosforescencia. Como los procesos radiativos son mucho más lentos que la pérdida de energía vibracional, frecuentemente, ambos procesos se producen desde el estado excitado térmicamente más estable, que es el estado excitado correspondiente más bajo en energía (S_1 y T_1 , respectivamente). En la Figura 16 se muestran, en un diagrama de Jablonski, los diferentes procesos de relajación que pueden tener lugar tras la excitación inicial.

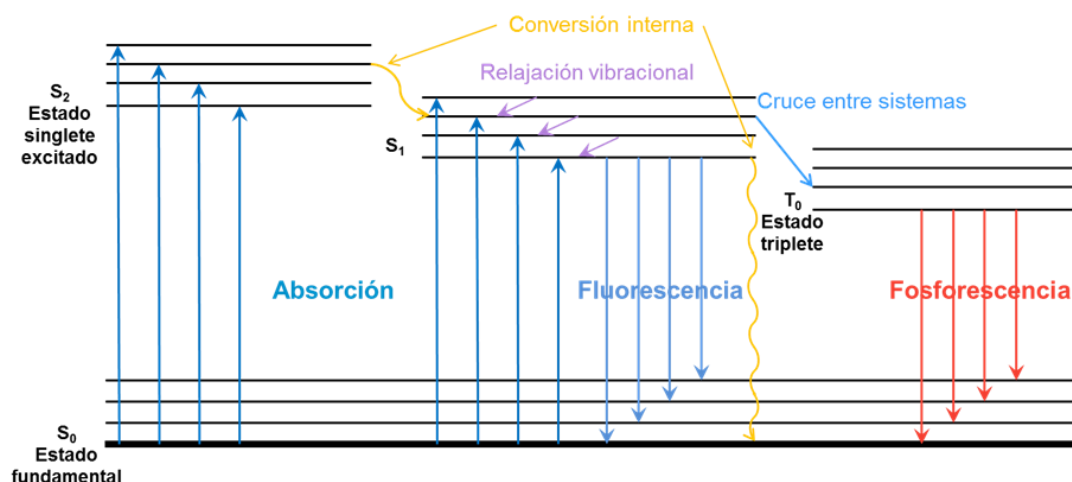


Figura 16. Diagrama de Jablonski que ilustra los estados electrónicos de una molécula.

La secuencia de los pasos involucrados en la fluorescencia son los siguientes: en la primera etapa la absorción de un fotón lleva a la molécula del estado fundamental singlete, S_0 , a un estado singlete electrónicamente excitado, S_1 . Una vez en el estado excitado una parte de la energía de la molécula se pierde a causa de los choques con las moléculas del disolvente y la molécula desciende en la escala de niveles vibracionales hasta alcanzar el nivel más bajo del estado excitado en un proceso conocido como relajación vibracional. Por último, se produce el regreso a un nivel de vibración del estado fundamental S_0 mediante emisión de fotones (fluorescencia). De modo que la transición electrónica que genera el fotón se produce entre orbitales electrónicos con el mismo spin (singlete-singlete). Si la transición electrónica se produce entre orbitales de distinto spin (singlete-triplete) se denomina fosforescencia (Figura 16).

La emisión siempre será de menor energía que la energía absorbida, debido a que la transición emisora tiene lugar después de que parte de la energía vibracional haya sido disipada hacia el entorno. De tal manera, que la energía de emisión del fotón causa un desplazamiento en el espectro de emisión (o fluorescencia) hacia longitudes de onda mayores, respecto al espectro de absorción. Este desplazamiento entre las longitudes de onda de absorción y emisión se define como desplazamiento de Stokes. Además, teniendo en cuenta que la diferencia de energía entre los niveles vibracionales del estado fundamental y el primer estado excitado singlete son similares, el espectro de emisión o fluorescencia de un compuesto suele ser la imagen especular del espectro de absorción (Figura 17).

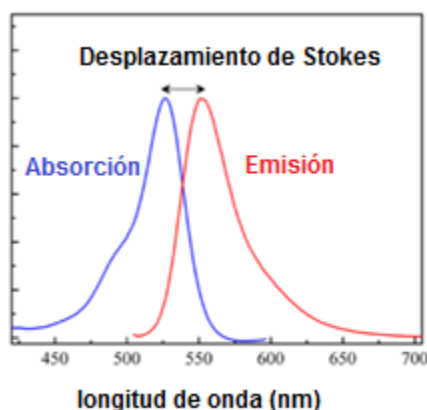


Figura 17. Diagrama del espectro de excitación y de emisión de un fluoróforo.

Por lo que se refiere a los parámetros fotofísicos, el tiempo de vida y la intensidad de fluorescencia son las propiedades más importantes para la caracterización de los fluoróforos. Respecto a la intensidad de fluorescencia, esta depende del coeficiente de extinción molar del fluoróforo, ϵ , y del rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) que se define como la relación de fotones emitidos por fluorescencia con respecto al total de fotones absorbidos. Además es una constante física que depende de la temperatura y, en general, de las condiciones del entorno de las moléculas excitadas. El rendimiento cuántico máximo es 1.0 (100%), es decir cuando cada fotón absorbido produce un fotón emitido. No obstante, los fluoróforos con rendimiento cuántico de 0.10 son considerados como buenos fluoróforos.¹⁸¹

El tiempo de vida de emisión fluorescente, se define como el tiempo promedio que permanece la molécula en el estado de excitación antes de emitir un fotón. Este parámetro se puede calcular por técnicas de conteo de fotones individuales (single photon counting) que consisten en medir del tiempo necesario de un único fotón de pasar desde la muestra al detector y compararlo con una señal de referencia.

Con relación a factores que influyen en las propiedades fotofísicas de la fluorescencia, éstas no solo dependen de los factores del entorno químico como la temperatura, la naturaleza del disolvente, el pH y la concentración del fluoróforo, sino también de la estructura y rigidez estructural del mismo. Así, por ejemplo, en el caso de

¹⁸¹ a) Eisenberg, D.; Crothers, D. *Physical Chemistry with Applications in the Life Sciences*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Ch. **1979**, 16, 749–797. b) Brown, A.; Jordan, C. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **1980**, 191, 37-41.

un fluoróforo con muchos enlaces múltiples conjugados se produce un desplazamiento de las bandas espectrales del fluoróforo hacia la región menos energética del visible.¹⁸²

Por otro lado, la introducción de impedimentos estéricos en la estructura molecular del fluoróforo normalmente mejora el rendimiento cuántico de fluorescencia, dado que la rigidificación de la molécula reduce los procesos de rotación y la distorsión de ésta, de manera que se eliminan las interacciones que pudieran dar lugar a transiciones no radiativas. Otros factores que afectan positivamente a la fluorescencia son la planaridad del sistema π conjugado y la presencia de sustituyentes electroattractores y electrodonadores en la molécula.¹⁸³

La primera observación descrita de la fluorescencia se debe a John Frederick William Herschel, en 1845, en una disolución de quinina a la luz del sol.¹⁸⁴ Desde entonces, la fluorescencia ha sido ampliamente aplicada en muchos campos de la ciencia, tales como la electrónica, la medicina (con fines terapéuticos), la fotografía o la mineralogía.

La fluorescencia de una molécula se analiza mediante la espectroscopía de fluorescencia o espectrofluorimetría, que es un tipo de espectroscopía electromagnética. La espectrofluorimetría es una técnica instrumental ampliamente utilizada, muy sensible, eficaz, de fácil manejo y respuesta rápida para el análisis cuantitativo y cualitativo de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas.

Durante los últimos años, los avances realizados en el campo de las técnicas de bioimagen, biodetección, diagnóstico médico y detección ambiental, han permitido la visualización de biomoléculas y la transformación de información química y biológica en una señal detectable. Entre estas técnicas, la fluorescencia de imagen se ha convertido en una excelente herramienta que permite el seguimiento *in situ* de iones y biomoléculas, debido a su alta resolución espacio tiempo.¹⁸⁵ Es por esto que el desarrollo de esta técnica ha generado un creciente interés dentro de la química, la bioquímica, la medicina y la ciencia de los materiales.

¹⁸² Krasovitskii, B. M.; Bolotin, B. M. *Organic Luminescent Materials*, VCH Publishers, New York, 1988, capítulo. 18. 4.

¹⁸³ Pereyaslova, D. G.; Skripkina V. T.; Yagupolsky, L. M. *Zh. prikladn. Spektroskopii*. **1972**, 17, 101.

¹⁸⁴ Herschel, F. W. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **1845**, 135, 143–145.

¹⁸⁵ Germain, R. N.; Robey, E. A.; Cahalan, M. D. *Science*, **2012**, 336, 1676-1681.

Más recientemente, se ha producido un gran interés en el desarrollo de sondas fluorescentes capaces de penetrar en células vivas y ofrecer información cualitativa y cuantitativa de la estructura y función celular, para su utilización en estudios biológicos. Estos avances han permitido aplicar las sondas fluorescentes en áreas tan importantes como la administración de fármacos en los ensayos biológicos y el diagnóstico médico.

186,187,188,189,190,191,192

Es importante mencionar que el uso de los fluoróforos en el campo de la medicina requiere la emisión de éstos en la región espectral del infrarrojo cercano (NIR) (>650 nm), a las cuales son más transparentes los tejidos biológicos. Este rango de longitudes de onda del espectro electromagnético es lo que se conoce como ventana biológica o ventana terapéutica. En esta región comprendida entre 650 y 1000 nm aproximadamente, los fenómenos de auto fluorescencia y absorción del agua son mínimos, no hay interferencias con la emisión fluorescente de las biomoléculas presentes en el medio, lo que se traduce en una mayor resolución y sensibilidad en los procesos de monitorización de marcadores fluorescentes, y en un mayor poder de penetración del haz de luz láser incidente, alcanzando entre 2 y 5 cm.

Al mismo tiempo, otras aplicaciones dónde el uso de los fluoróforos se ha incrementado durante los últimos años ha sido como generadores de láser. La tecnología basada en empleo del láser (acrónimo de "*light amplification by stimulated emission of radiation*", amplificación de luz por emisión estimulada de radiación) ha presentado un avance significativo sobre la investigación científica y en la actualidad es empleado en diversas áreas de la ciencia, la ingeniería, la industria o la medicina entre otras, así como en el desarrollo de técnicas espectroscópicas avanzadas de alta resolución.

El láser es un dispositivo que produce luz amplificada por emisión estimulada, lo que genera un haz de gran intensidad, direccionalidad y coherencia. El término láser

¹⁸⁶ a) Su, X.; Xiao, X. J.; Zhang, C.; Zhao, M. P. *Appl. Spectrosc.*, **2012**, 66, 1249-1262. b) Sekar, R. B.; Periasamy, A. J. *Cell. Biol.*, **2003**, 160, 629-633. c) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2620-2640. d) King, W.; Proffitt, J.; Morrison, L. *Mol. Diagn.*, **2000**, 5, 309-319.

¹⁸⁷ Rudin, M.; Weissleder, R. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, 2, 123-131.

¹⁸⁸ Lichtman, J. W.; Conchello, J. A. *Nat. Methods*, **2005**, 2, 910-919.

¹⁸⁹ Domaille, D. W.; Que E. L.; Chang, C. J. *Nat. Chem. Biol.*, **2008**, 4, 168-175.

¹⁹⁰ Ueno, T.; Nagano, T. *Nat. Methods*, **2011**, 8, 642-645.

¹⁹¹ Urano, Y.; Sakabe, M.; Kosaka, N.; Ogawa, M.; Mitsunaga, M.; Asanuma, D.; Kamiya, M.; Young, M. R.; Nagano, T.; Choyke P. L.; Kobayashi, H. *Sci. Transl. Med.*, **2011**, 3, 110-119.

¹⁹² Yuan, L.; Lin, W.; Cao, Z.; Long L.; Song, J. *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 689-696.

abarca la gran variedad de sistemas capaces de producir este tipo radiación independientemente de los mecanismos que se empleen para conseguirlo. Básicamente un sistema láser consiste en:

- Una sustancia emisora o medio activo, que proporciona los átomos, iones o moléculas en los niveles adecuados para permitir la producción de la luz amplificada.
- Una fuente de energía necesaria para excitar el medio activo por algunos de los diferentes métodos de bombeo existentes.
- Una cavidad óptica resonante, que facilita la retroalimentación de la luz que se amplifica y que consta de dos espejos paralelos a cada lado del medio de propagación láser.

La obtención de la emisión láser se basa en la excitación de muchos átomos que forman el medio activo, empleando la fuente de bombeo. Como resultado del bombeo intenso se consigue una inversión de población, es decir, que haya más átomos, moléculas o iones en el estado excitado que en el fundamental. Cuando un electrón de uno de estos estados excitados decae espontáneamente al estado fundamental, se emite un fotón que, a su vez, por el principio de resonancia, puede provocar la emisión estimulada de un segundo fotón desde otro estado excitado. La radiación de todos los fotones emitidos se sincronizan en frecuencia (monocromaticidad) y en fase (coherencia temporal y espacial) mediante un proceso denominado emisión estimulada.

Los láseres se pueden clasificar en función de la naturaleza del medio activo utilizado: de fase gaseosa, de fase líquida, o de fase sólida. Dentro de los láseres líquidos destacan los colorantes láser, donde el medio activo es un colorante disuelto en un disolvente. Este tipo de láseres ha proporcionado un instrumento eficaz para la producción de emisión láser en un amplio intervalo de longitudes de onda que va desde 220 (gracias al doblado de frecuencias) a 930 nm y además presenta la ventaja de poder seleccionar la longitud de onda de emisión.

Durante estos últimos años se han conseguido materiales láser con excelentes características, pero cuya emisión está limitada a la región espectral entre 550 y 600 nm. Para lograr que estos sistemas puedan competir con los actualmente comercializados en fase líquida hay que sintetizar y desarrollar nuevos materiales láser eficientes y estables, extendiendo su emisión a las regiones extremas del visible: 400-550 nm y 600-700 nm.

A partir de las anteriores consideraciones, las características químicas y fotofísicas óptimas que debe tener un fluoróforo para ser aplicado tanto como sonda fluorescente en el campo de la medicina o como colorante de láser son:

- Un desplazamiento de Stokes grande.
- Altos rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ entre 0.5 y 1.0).
- Buena fotoestabilidad, termoestabilidad y estabilidad química.
- Baja tendencia a agregarse, ya que los agregados desactivan la emisión radiante de los monómeros.¹⁹³
- Buena solubilidad en disolventes orgánicos y medios acuosos
- Intensa absorción y emisión en la región espectral del infrarrojo cercano.
- Fáciles de acceder mediante síntesis orgánica.

Hoy en día existen distintos fluoróforos como la rodamina, la fluoresceína, la cumarina, la cianina y sus respectivos derivados que han sido empleados en este tipo de aplicaciones (Figura 18). No obstante, existe una serie de limitaciones asociadas a las propiedades fotofísicas de estos compuestos que impiden su implementación en ciertas aplicaciones y por ello continúa existiendo un interés claro en el desarrollo de nuevos colorantes orgánicos con propiedades fotofísicas mejoradas.

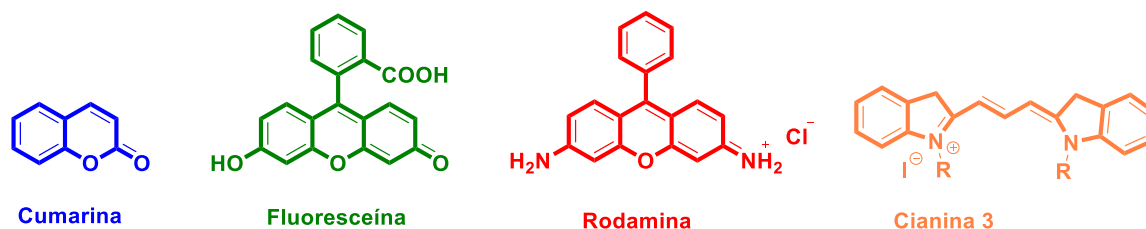


Figura 18. Colorantes comúnmente empleados en el marcaje de biomoléculas.

II.1.2 Colorantes BODIPY

II.1.2.1 Generalidades

El grupo de los 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos, conocidos habitualmente con el nombre comercial BODIPY (borodifluoro dipirrometeno) son considerados hoy en día como una de las familias de colorantes orgánicos más

¹⁹³ López Arbeloa, F.; Ruiz Ojeda, P.; López Arbeloa, I.; *J. Photochem. Photobiol.*, **1988**, 45, 313-323.

populares debido a sus interesantes características químicas y fotofísicas, y a su versatilidad.¹⁹⁴

El núcleo del BODIPY está formado por dos pirroles unidos por un grupo metileno, que permite la deslocalización de la densidad electrónica π entre ambos anillos, y un grupo BF_2 que no participa en la deslocalización pero confiere rigidez a la estructura, constituyendo así un complejo dipirrometénico- BF_2 . El sistema de numeración IUPAC para el núcleo de BODIPY (Figura 19c) es el empleado para el carbociclo análogo, *s*-indaceno (Figura 19b), y difiere del empleado para el sistema de dipirrometeno (Figura 19a), si bien los términos α -, β - y meso- indican las mismas posiciones en los núcleos de dipirrometeno y BODIPY.¹⁹⁵

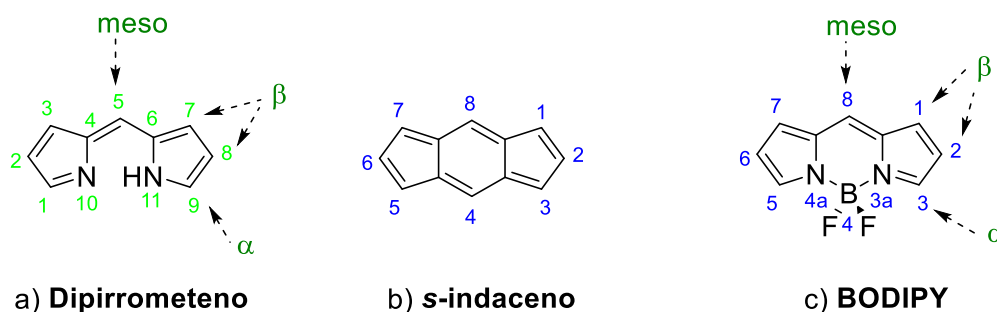


Figura 19. Estructuras de los núcleos de: a) dipirrometeno, b) *s*-indaceno, c) BODIPY.

Estos colorantes son moléculas neutras con estructura formal de zwitterion, que tienen una carga negativa en el átomo de boro (tetracoordinado) y una carga positiva en principio localizada en un átomo de nitrógeno. No obstante, esta carga positiva es susceptible de deslocalizarse a través del sistema π electrónico del cromóforo, dando lugar a varias formas resonantes que justifican su baja polaridad y su alta solubilidad en medios orgánicos (Figura 20).

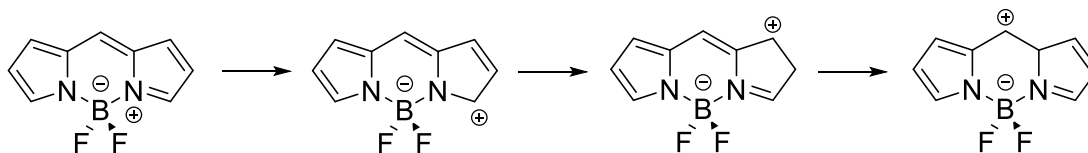
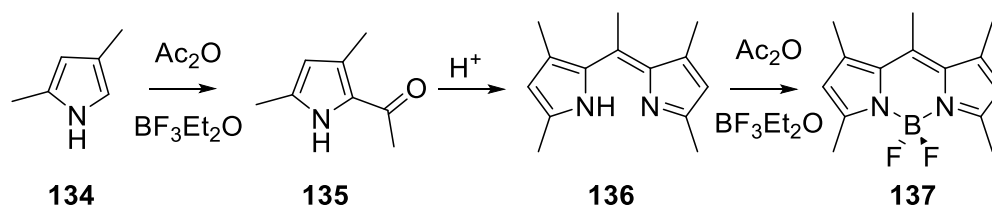


Figura 20. Formas resonantes para el núcleo de BODIPY.

¹⁹⁴ a) Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891–4932. b) Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1184–1201. c) Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1130–1172. d) Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 77–88.

¹⁹⁵ Dixon, H. B. F.; Cornish-Bowden, A.; Liebecq, C.; Loening, K. L.; Moss, G. P.; Reedijk, J.; Velick, S. F.; Venetianer, P.; Vliegthart, J. F. G. *Pure Appl. Chem.*, **1987**, *59*, 779–832.

Los primeros derivados de BODIPYs fueron descritos por Alfred Treibs y Franz-Heinrich Kreuzer en 1968,¹⁹⁶ como resultado de la reacción de 2,4-dimetilpirrol **134** y trifluoruro de boroeterato en presencia de anhídrido acético, mientras se intentaba la acetilación del anillo pirrólico, como se muestra en el Esquema 45.



Esquema 45. Primera síntesis de un derivado de BODIPY por Treibs y Kreuzer.

Sin embargo, hasta finales de 1980 no se concedió más atención a los derivados de BODIPY y a sus posibles aplicaciones como por ejemplo en el etiquetado biológico.^{197,198} En 1989 se describió por primera vez el uso de moléculas marcadas con BODIPYs como sondas dopaminérgicas altamente selectivas.¹⁹⁹ Desde entonces, las aplicaciones y los ámbitos de utilización de estos colorantes han aumentado enormemente. Como resultado de esta expansión, se ha desarrollado una intensa actividad investigadora centrada en la síntesis y caracterización de colorantes derivados de BODIPY con diferentes propiedades fotofísicas.^{200,201,202,203} Una prueba del interés existente en este tipo de compuestos es la comercialización, hoy en día, de una amplia variedad de derivados de BODIPYs como sondas fluorogénicas para el etiquetado de un gran número de biomoléculas.²⁰⁴

¹⁹⁶ Treibs, A.; Kreuzer, F.H.; *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 718, 208-223.

¹⁹⁷ Worries, H. J.; Koek, J. H.; Lodder, G.; Lugtenburg, J.; Fokkens, R.; Driessen, O.; Mohn, G. R. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1985**, 104, 288-291.

¹⁹⁸ Falk, H.; Hofer, O.; Lehner, H. *Monatsh. Chem.*, **1974**, 105, 169-178.

¹⁹⁹ Monsma, F.; Barton, A.; Kang, H.; Brassard, D.; Haugland, R.; Sibley, D. *J. Neurochem.* **1989**, 52, 1641-1644.

²⁰⁰ Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 1130-1172.

²⁰¹ Qian, X.; Xiao, Y.; Xu, Y.; Guo, X.; Qian, J.; Zhu, W. *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 6418-6436.

²⁰² Niu, S. L.; Massif, C.; Ulrich, G.; Renard, P. Y.; Romieu, A.; Ziessel, R. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 7229-7242.

²⁰³ Osorio-Martinez, C. A.; Urias-Benavides, A.; Gomez-Duran, C. F. A.; Bañuelos, J.; Esnal, I.; Lopez-Arbeloa, I.; Peña-Cabrera, E. *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 5434-5438

²⁰⁴ Molecular Probes; <http://probes.invitrogen.com>.

II.1.2.2 Propiedades fotofísicas de los BODIPYs

Los BODIPYS poseen una serie de características fundamentales^{205,206,207,208} que los hace especialmente interesantes para su uso en distintas aplicaciones. Estas características incluyen elevados coeficientes de absorción molar en la zona del UV, altos rendimientos cuánticos (cerca de la unidad), bandas de emisión de fluorescencia estrechas y eficiente emisión láser en disolución.²⁰⁹ Por otro lado, estos derivados tienen baja tendencia a la agregación,²¹⁰ son estables a la irradiación con luz y relativamente estables a los cambios de polaridad y pH en medio fisiológico. Por último, también cabe destacar su versatilidad química, que permite mediante pequeñas modificaciones estructurales modificar sus propiedades fluorescentes.

De acuerdo con los altos valores de rendimiento cuántico de fluorescencia que presentan los BODIPYs, la excitación a estados tripletes es baja, por lo que no es habitual que se produzca el cruce entre sistemas singlete-triplete. De hecho, existen pocos ejemplos de detección de fosforescencia de un derivado de BODIPY.²¹¹

El espectro de absorción de los colorantes tipo BODIPY, presenta una serie de características propias. En primer lugar, muestran una banda principal intensa referente a la transición desde su estado fundamental al primer estado excitado (S_0-S_1), con un

²⁰⁵ Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891–4932.

²⁰⁶ a) Ulrich, G.; Zissel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1184–1201. b) Benniston, A. C.; Copley, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, 4124–4131. c) Zissel, R.; Harriman, A. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 611–631. d) Peña-Cabrera, E.; Aguilar-Aguilar, A.; González-Domínguez, M.; Lager, E.; Zamudio-Vázquez, R.; Godoy-Vargas, J.; Villanueva-García, F. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3985–3988. e) Kim, K.; Jo, C.; Easwaramoorthi, S.; Sung, J.; Kim, D. H.; Churchill, D. G. *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 4881–4894. f) Choi, S. H.; Kim, K.; Lee, J.; Do, Y.; Churchill, D. G. *J. Chem. Crystallogr.*, **2007**, *37*, 315–331.

²⁰⁷ a) Ulrich, G.; Zissel, R. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 2070–2083. b) Rohand, T.; Baruah, M.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W. *Chem. Commun.*, **2006**, 266–268. c) Jiao, L.; Yu, C.; Li, J.; Wang, Z.; Wu, M.; Hao, E. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 7525–7528. d) Palma, A.; Tasiar, M.; Frimannsson, D. O.; Vu, T. T.; Meallet-Renault, R.; O'Shea, D. F. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3638–3641. e) Mula, S.; Ulrich, G.; Zissel, R. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 6383–6388. f) Zhu, S.; Zhang, J.; Vegesna, G. K.; Pandey, R.; Luo, F. T.; Greena, S. A.; Liu, H. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 3508–3510. g) Zhu, S.; Zhang, J.; Vegesna, G.; Luo, F. T.; Green, S. A.; Liu, H. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 438–441. h) Lee, J. S.; Kang, N.; Kim, Y. K.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H. K.; Vendrell, M.; Park, J. H.; Chang, Y. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 10077–10082.

²⁰⁸ a) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2^a ed.; Kluwer Academic: New York, **1999**. b) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, **2001**.

²⁰⁹ a) Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M. L.; Wolford, L. T.; Boyer, J. H.; Politzer, I. R.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.* **1990**, *1*, 389–399. b) Boyer, J. H.; Haag, A. M.; Sathymoorthi, G.; Soong, M. L.; Thangaraj, K.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.*, **1993**, *4*, 39–49.

²¹⁰ Lopez-Arbeloa, F.; Arbeloa, T.; Lopez-Arbeloa, I., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1999**, *121*, 177–182.

²¹¹ a) Chen, Y.; Zhao, J.; Xie, L.; Guo, H.; Li, Q. *RSC Adv.*, **2012**, *2*, 3942–3953. b) Banerjee, S.; Kuznetsova, R. T.; Papkovsky, D. B. *Sens. Actuators B*, **2015**, *212*, 229–234.

hombro a causa de la estructura vibracional. En segundo lugar, y a menor longitud de onda se encuentra una segunda banda más débil, asociada a la transición hasta el segundo estado excitado (S_0-S_2). Por último, de acuerdo con lo comentado anteriormente, el espectro de fluorescencia es la imagen especular del de absorción. (Figura 21).

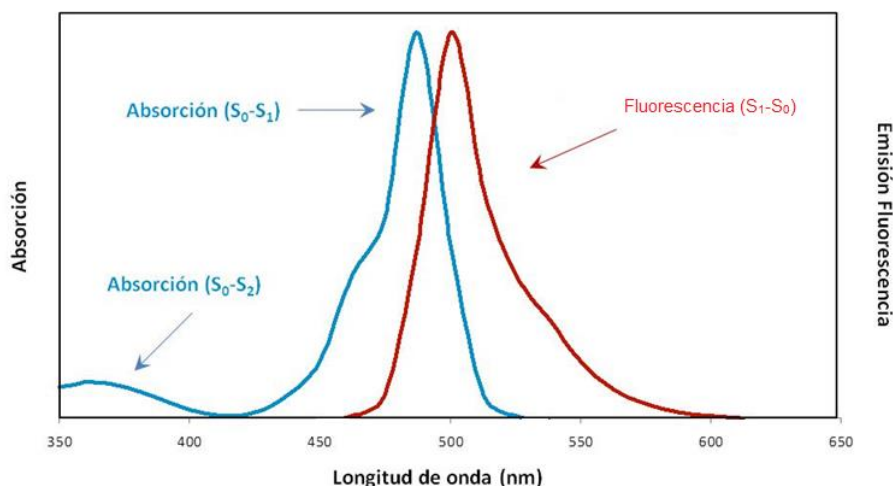


Figura 21. Espectro de absorción y fluorescencia de un BODIPY típico.²¹²

Una de las principales razones por las que los BODIPYs han sido objeto de tantas aplicaciones es, sin duda, su versatilidad química. Son sistemas reactivos que pueden experimentar variadas reacciones en las diferentes posiciones de su núcleo. Es conocido que las propiedades espectroscópicas tales como el desplazamiento de las bandas espectrales son sensibles a la modificación del núcleo pirrol,²¹³ a la posición meso (C-8),^{214,215} y a los sustituyentes del átomo de boro.²¹⁶ De todas las posibilidades, la funcionalización en la posición C-8 (*meso*) del núcleo de BODIPY con un grupo arilo se ha implementado como una de las estrategias más versátiles para la preparación de BODIPYs que permitan incorporar ligandos,²¹⁷ auxiliares quirales,²¹⁸ grupos con propiedades donador-aceptor,²¹⁹ y grupos solubilizantes en agua.²²⁰

²¹² *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11^o Edition" Molecular Probes, **2010**, cap. 1, 57-59.

²¹³ (a) Haugland, R. P.; Kang, H. C. US 4,774,339, **1998**. (b) Thoresen, L. H.; Kim, H.; Welch, M. B.; Burghart, A.; Burgess, K. *Synlett*, **1998**, 1276-1278.

²¹⁴ Goze, C.; Ulrich, G.; Charbonnière, L.; Ziessel, R. *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 3748-3755.

²¹⁵ Qin, W.; Baruah, M.; Der Auweraer, M. van; De Schryver, F. C.; Boens, N. *J. Phys. Chem. A.*, **2005**, 109, 7371-7384.

²¹⁶ Ulrich, G.; Goze, C.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3694-3698

²¹⁷ Ulrich, G.; Ziessel, R., *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 2070-2083.

En este sentido, la presencia de sustituyentes de tipo arilo con libertad de giro sobre C-8 presenta la desventaja de una disminución de su rendimiento cuántico dado que facilitan los acoplamientos vibracionales que desembocan en un aumento de la conversión interna.²²¹ Sin embargo, el rendimiento cuántico de estos BODIPYs aril-derivados en C-8 se puede restaurar mediante la incorporación de impedimentos estéricos que limiten la libertad rotacional alrededor del enlace C8-arilo. Como se puede observar en la Figura 22, la restricción rotacional del grupo arilo se puede lograr fácilmente mediante la introducción de grupos metilo en las posiciones C-1 y C-7 del núcleo del BODIPY y/o por la sustitución en posición *orto* del sustituyente aromático sobre C-8. En la Figura 22 se muestra el efecto en algunas propiedades fotofísicas en BODIPYs diferentemente sustituidos en posición meso y en presencia o ausencia de grupos metilo sobre las posiciones C-1 y C-7. En este contexto, es de resaltar el gran rendimiento cuántico de los derivados sin sustituyente en C-8, **138**, **139**, $\phi_f = 0.90$ y 0.85 , respectivamente, en comparación con el derivado arilado en C-8 sin restricciones rotacionales **140** ($\phi_f = 0.025$). La incorporación de grupos metilo en C-1 y C-7 regenera parte del rendimiento cuántico en **141** ($\phi_f = 0.65$), y la totalidad en **142** ($\phi_f = 0.96$).

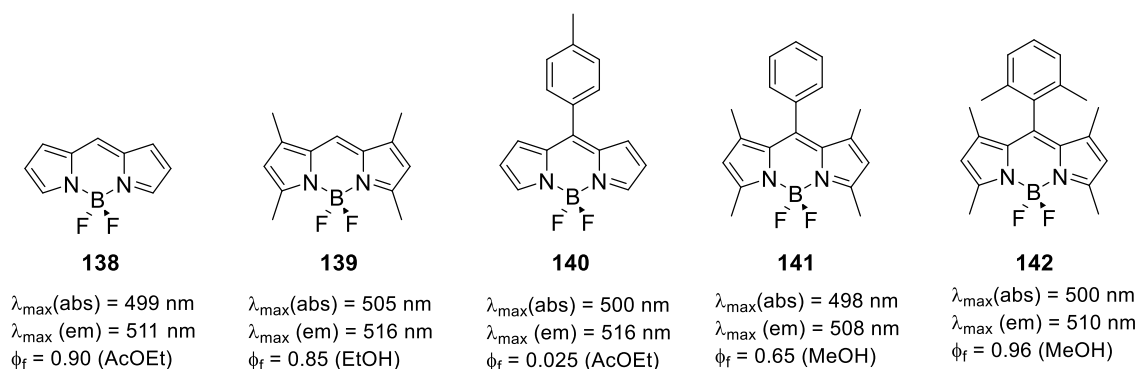


Figura 22. Influencia en las propiedades espectroscópicas de un sustituyente meso arilo (C-8) en combinación con grupos metilo en C-1 y C-7.

Además, es importante destacar que, una vez lograda la restricción de giro la arilación en la posición meso del BODIPY no supone una modificación drástica en sus bandas espectrales de absorción ni de las de emisión, ya que el esqueleto del BODIPY y el sustituyente meso presentan una disposición ortogonal, de tal manera que sólo se

²¹⁸ a) Móczár, I.; Huszthy, P.; Maidics, Z.; Kádár, M.; Klára, T. *Tetrahedron*, **2009**, 65, 8250–8258; b) Gossauer, A.; Nydegger, F.; Kiss, T.; Slezziak, R.; Stoeckli-Evans, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 1772–1780.

²¹⁹ a) Zrig, S.; Remy, P.; Andrioletti, B.; Rose, E.; Asselberghs, I.; Clays, K., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 1563–1566; b) Ziessel, R.; Bonardi, L.; Ulrich, G., *Dalton Trans.*, **2006**, 2913–2918; c) Wu, L.; Loudet, A.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 9156–9157

²²⁰ Thivierge, C.; Bandichhor, R.; Burgess, K., *Org. Lett.*, **2007**, 9, 2135–2138.

²²¹ Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4891–4932.

produce una débil conjugación entre el núcleo de BODIPY y el sustituyente aromático (por ejemplo, el derivado 8-tolil BODIPY representado en la Figura 23 presenta un ángulo diedro de 90° entre el sistema dipirrólico y el sustituyente aromático).^{222,223,224}

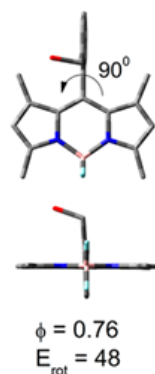


Figura 23. Geometría optimizada para 8-tolil BODIPY. El ángulo diedro representa la conformación más estable, la barrera rotacional (E_{rot} en kcal / mol), calculada a partir de la energía potencial.

II.1.2.3 Síntesis de BODIPYs

Las aproximaciones sintéticas al núcleo de BODIPY se basan fundamentalmente en la química de pirroles, y en la de dipirrometanos desarrollados como precursores sintéticos de porfirinas y otros compuestos macrocíclicos.²²⁵ Aunque se han preparado un buen número de derivados de BODIPY, la síntesis del BODIPY sin sustituyentes ha sido sólo resuelta recientemente, debido a la inestabilidad del dipirrometeno precursor. Tres grupos de investigación independientes²²⁶ describieron la síntesis y caracterización del BODIPY **138**, de acuerdo con las rutas sintéticas mostradas en el Esquema 46. De todas ellas, cobra especial relevancia la desarrollada por Peña-Cabrera y colaboradores,²²⁷ ya que, a diferencia de los métodos alternativos, logran obtener el

²²² Duran-Sampedro, G.; Agarrabeitia, A. R.; Garcia-Moreno, I.; Costela, A.; Bañuelos, J.; Arbeloa, T.; López-Arbeloa, I.; Chiara, J. L.; Ortiz, M. J., *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 2012, 6335–6350.

²²³ a) Baruah, M.; Qin, W.; Flors, C.; Hofkens, J.; Vallée, R. A. L.; Beljonne, D.; Van der Auweraer, M.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N., *J. Phys. Chem. A*, **2006**, 110, 5998-6009; b) Baruah, M.; Qin, W.; Basaric, N.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N., *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 4152-4157.

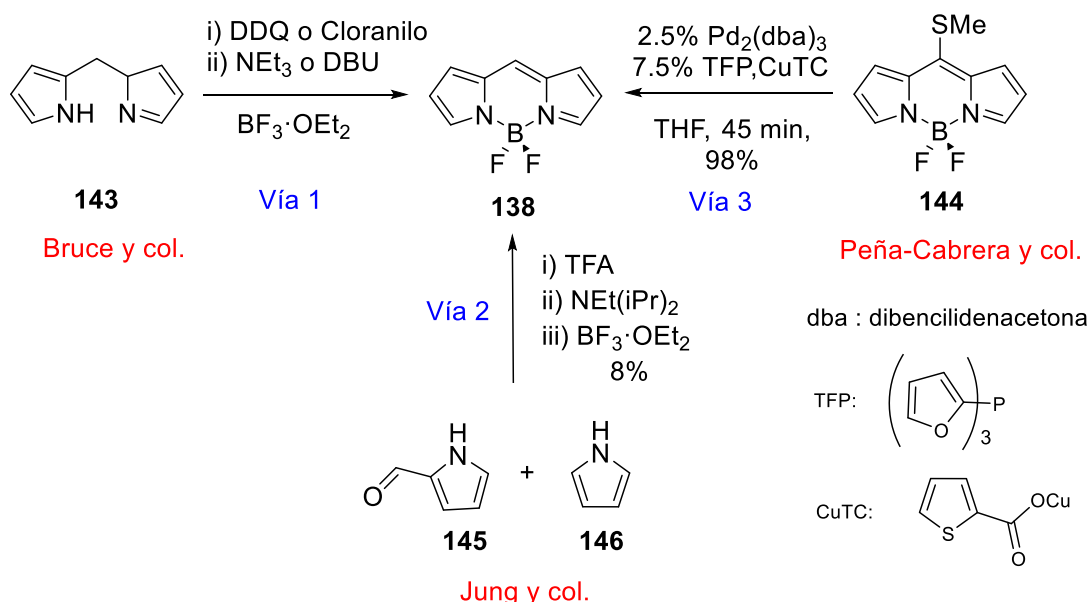
²²⁴ Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 1130-1172.

²²⁵ Zheng, Q.; Xu, G.; Prasad, P. N., *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 5812-5819.

²²⁶ a) Qin, W.; Baruah, M.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N., *J. Photochem. Photobiol. A*, **2006**, 183, 190-197. b) Tram, K.; Yan, H.; Jenkins, H. A.; Vassiliev, S.; Bruce, D., *Dyes Pigm.*, **2009**, 82, 392-395. c) Arroyo, I. J.; Hu, R.; Merino, G.; Tang, B. Z.; Peña-Cabrera, E., *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 5719-22.

²²⁷ Peña-Cabrera, E.; Aguilar-Aguilar, A.; González-Domínguez, M.; Lager, E.; Zamudio-Vázquez, R.; Godoy-Vargas, J.; Villanueva, F., *Org. Lett.* **2007**, 9, 3985-3988.

producto con buen rendimiento. Su estrategia se basa en el uso del 8-tiometil BODIPY **144**, que por tratamiento con trietilsilano en presencia de una cantidad catalítica de paladio y cantidades estequiométricas de 2-tienil-carboxilato de cobre (I) (CuTC) origina el BODIPY “desnudo” **138**.



Esquema 46. Aproximaciones sintéticas al BODIPY **138**.

II.1.2.3.1 BODIPYs simétricos

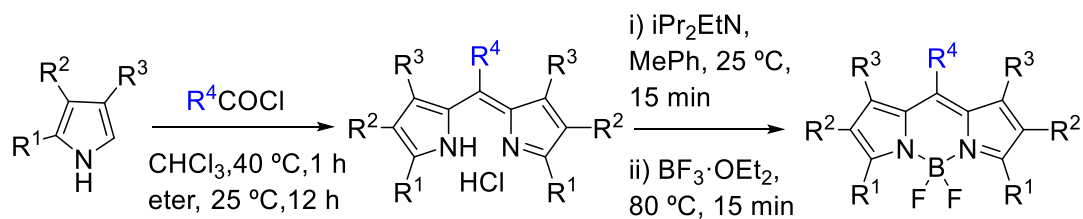
En lo referente a la síntesis de **BODIPYs simétricos**, que incorporan un sustituyente sobre la posición C-8, en la actualidad existen fundamentalmente dos estrategias sintéticas:

i) Condensación de pirroles con cloruros de ácido o anhídridos

La primera estrategia, y la forma más directa de preparar BODIPYs simétricos, es la condensación de 1-H-pirroles con cloruros de ácido para formar un hidrocloruro de dipirrometeno intermedio, que se hace reaccionar *in situ* con BF₃·Et₂O en presencia de una base nitrogenada terciaria [trietilamina o DBU (1,8 diazabicyclo [5,4,0] undeco-7-eno)] (Esquema 47).^{228,229}

²²⁸ Boyer, J. H.; Haag, A. M.; Sathyamoorthi, G.; Soong, M. L.; Thangaraj, K.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.*, **1993**, 4, 39-49.

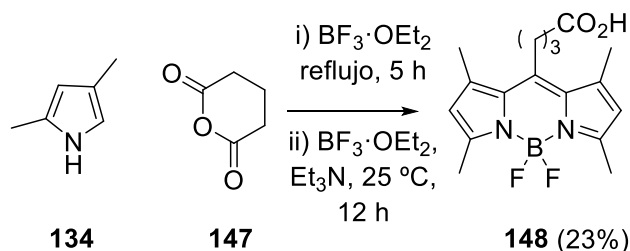
²²⁹ Shah, M.; Thangraj, K.; Soong, M. L.; Wolford, L.; Boyer, J. H.; Politzer, I. R.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chem.*, **1990**, 1, 389-399.



Esquema 47. Síntesis de BODIPYs simétricos a partir de pirroles y cloruros de ácido.

Esta estrategia no es efectiva para la obtención de BODIPYs sin sustituyentes en los anillos de pirrol ya que el cloruro de ácido reacciona con las posiciones libres del pirrol originando mezclas complejas de reacción.

Cabe mencionar que, como una extensión de esta estrategia, se ha descrito la condensación directa de anhídridos de diácidos carboxílicos tales como anhídrido glutárico y anhídrido succínico con pirrol (Esquema 48).²³⁰ Mediante esta metodología, simultáneamente a la formación del BODIPY meso sustituido, se libera una función carboxilo que puede ser empleada para su conjugación con biomoléculas (Esquema 48).²³¹



Esquema 48. Síntesis del BODIPY **148** a partir de anhídrido glutárico y pirrol.

ii) Condensación de pirroles con aldehídos

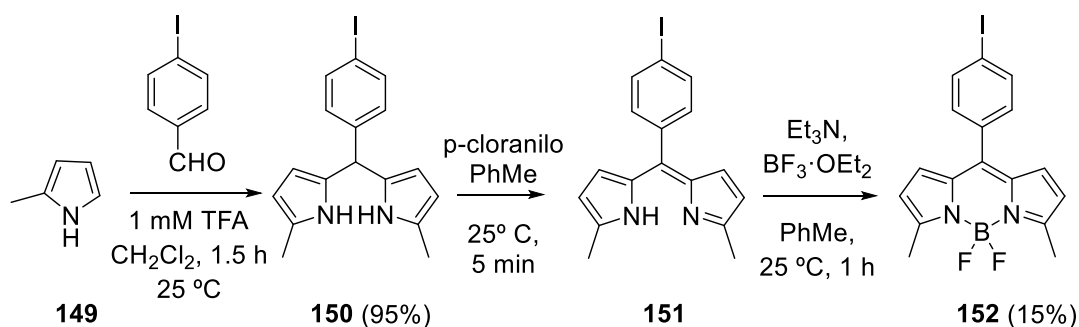
Alternativamente, la síntesis de BODIPYs meso-sustituidos simétricos puede llevarse a cabo por condensación de 1-H-pirroles con aldehídos aromáticos en presencia de un ácido. Esta estrategia requiere, sin embargo, una etapa de oxidación adicional del dipirrometano intermedio (p.ej. **150**, Esquema 49).²³² Esta oxidación se puede llevar a cabo con diferentes reactivos, siendo los más habituales 2,3-diciano-5,6-dicloro-1,4-benzoquinona (DDQ), o si se necesitan condiciones más suaves, *p*-cloranilo.²³³

²³⁰ Wang, D.; Fan, J.; Gao, X.; Wang, B.; Sun, S.; Peng, X. *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 7675-7683.

²³¹ Li, Z.; Mintzer, E.; Bittman, R. J., *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 1718-1721.

²³² Wagner, R. W.; Lindsey, J. S. *Pure Appl. Chem.*, **1996**, 68, 1373-1380.

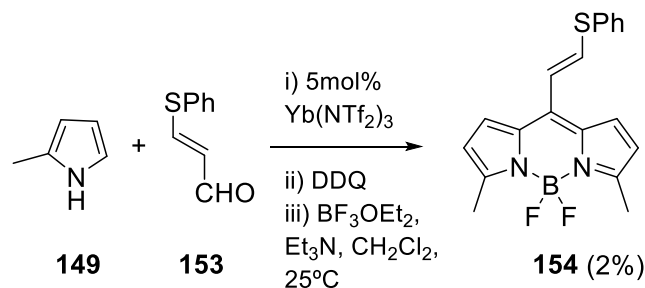
²³³ Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4891-4932.



Esquema 49. Síntesis de BODIPYs a partir de pirroles y aldehídos.

Las condiciones de acoplamiento adecuadas para la síntesis de BODIPYs sin sustituir en las posiciones α y β consisten en utilizar un exceso de 1-H-pirrol en condiciones ácidas en presencia de un aldehído aromático.²³⁴ Sin embargo, recientemente, se ha descrito la formación de dipirrometanos en medio acuoso ácido, utilizando menor exceso de pirrol que en el caso anterior.²³⁵

Una de las características más relevantes de esta estrategia es la amplia variedad de aldehídos aromáticos que pueden ser empleados. Sin embargo, la reacción con aldehídos no aromáticos transcurre con bajo rendimiento. En el Esquema 50 se muestra un ejemplo aislado del acoplamiento de un metil pirrol (**149**) con un aldehído α,β insaturado (**153**) para dar el derivado **154** (Esquema 50).²³⁶



Esquema 50. Síntesis del BODIPY **154** a partir de metil pirrol y un aldehído insaturado.

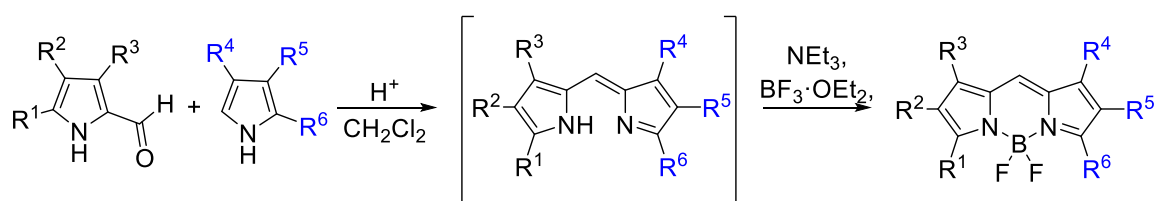
²³⁴ Baruah, M.; Qin, W.; Basaric, N.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4152-4157.

²³⁵ Rohand, T.; Dolusic, E.; Ngo, T. H.; Maes, W.; Dehaen, W. *Arkivoc*, **2007**, 307-324.

²³⁶ Goud, T. V.; Tutar, A.; Biellmann, J. F. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5084-5091.

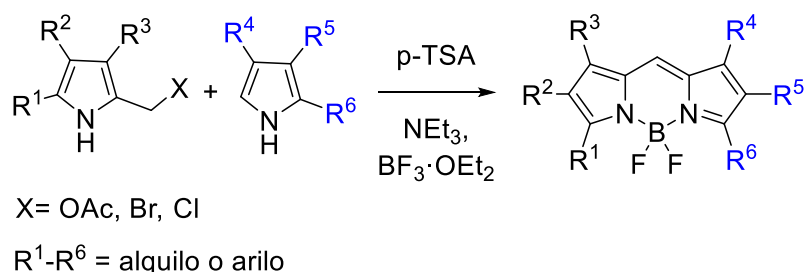
II.1.2.3.2 BODIPYs asimétricos

Por otro lado, la **síntesis de BODIPYs asimétricos** se puede llevar a cabo por condensación entre 2-formilpirrol o un cetopirrol, con un 1-H-pirrol (no sustituido en posición α) en presencia de un ácido. Este procedimiento se conoce como acoplamiento de MacDonald por analogía con una reacción similar de la química de porfirinas (Esquema 51).²³⁷ Como catalizadores se emplean generalmente ácido bromhídrico²³⁸ y oxocloruro de fósforo (POCl_3).²³⁹



Esquema 51. Síntesis de BODIPYs asimétricos.

Por último, otra alternativa para la obtención de dipirrometenos asimétricos consiste en el acoplamiento 2-halometil- o 2-acetoximetil-pirrol con un 1-H-pirrol, en condiciones ácidas. De esta manera es posible obtener BODIPYs asimétricos sin sustituyentes en posición meso (Esquema 52).²⁴⁰



Esquema 52. Síntesis de BODIPYs asimétricos a partir de 2-halometil o 2-acetoximetilpirroles.

²³⁷ Arsenault, G. P.; Bullock, E.; MacDonald, S. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384-4396.

²³⁸ Al-Sheikh-Ali, A.; Cameron, K. S.; Cameron, T. S.; Robertson, K. N.; Thompson, A. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4773-4775.

²³⁹ Wan, C. W.; Burghart, A.; Chen, J.; Bergstroem, F.; Johansson, L. B.A.; Wolford, M. F.; Kim, T. G.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R.; Burgess, K. *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 4430-4441.

²⁴⁰ Wod, T. E.; Thompson, A. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 1831-1861.

II. 2. Objetivos generales

El objetivo general que se persigue en esta sección de la Memoria consiste en evaluar estrategias sintéticas que permitan el marcaje fluorescente de distintos tipos de moléculas: carbohidratos, nucleósidos y otros derivados. En todos los casos se seguirá una aproximación modular, en la que se incorporará un sonda fluorescente sobre la molécula objetivo.

Para lograr el etiquetado fluorescente de moléculas los dos requisitos fundamentales son: (i) el disponer de fluoróforos de longitud de onda adecuada y que posean alto rendimiento cuántico de fluorescencia, y (ii) la presencia de un punto de reactividad adecuado en el fluoróforo para realizar la unión covalente a la molécula de interés. En este segundo aspecto son esenciales tanto la reactividad del grupo funcional empleado, como la estabilidad del enlace químico originado en la unión.

El colorante fluorescente de elección para éste trabajo fue el núcleo de BODIPY que, como ya se ha mostrado en la introducción, es un colorante que posee buenas propiedades fotofísicas, que puede usarse tanto en medios orgánicos como acuosos y que presenta gran estabilidad a diferentes rangos de pH.

Nos planteamos por tanto dos objetivos específicos:

- Desarrollar métodos eficientes de síntesis de derivados de BODIPYs que presenten un buen rendimiento cuántico de fluorescencia y que además posean un grupo funcional reactivo que pueda ser empleado como punto de anclaje o bioconjugación a las moléculas escogidas. Ante las múltiples posibilidades existentes, elegimos derivados de BODIPYs C-8 aril-sustituídos en los que la rotación alrededor del enlace C8-arilo, estuviese restringida por la presencia de un sustituyente *orto* en el sustituyente aromático. Esta característica, clave en nuestra elección, nos aseguraba a) una óptima emisión de fluorescencia al evitarse los procesos de desactivación no radiantes; b) una mayor estabilidad asociada a BODIPYs C-8 sustituidos en comparación con BODIPYs sin sustituyente, y c) la presencia de un punto de anclaje a la (bio)molécula.
- Diseñar estrategias sintéticas que permitan la combinación de los fluoróforos de tipo BODIPY preparados en el objetivo anterior con moléculas de interés biológico. Dentro de este objetivo se abordarán diferentes estrategias en función del grupo reactivo que incorpore el BODIPY y dependiendo de la naturaleza de

las moléculas a conjugar. Así se evaluará la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC) y la reacción de Staudinger/Aza-Wittig.

II.3 Desarrollo de métodos eficientes de síntesis de derivados de BODIPYs C-8 aril-sustituídos

II.3.1 Antecedentes y estado actual del tema

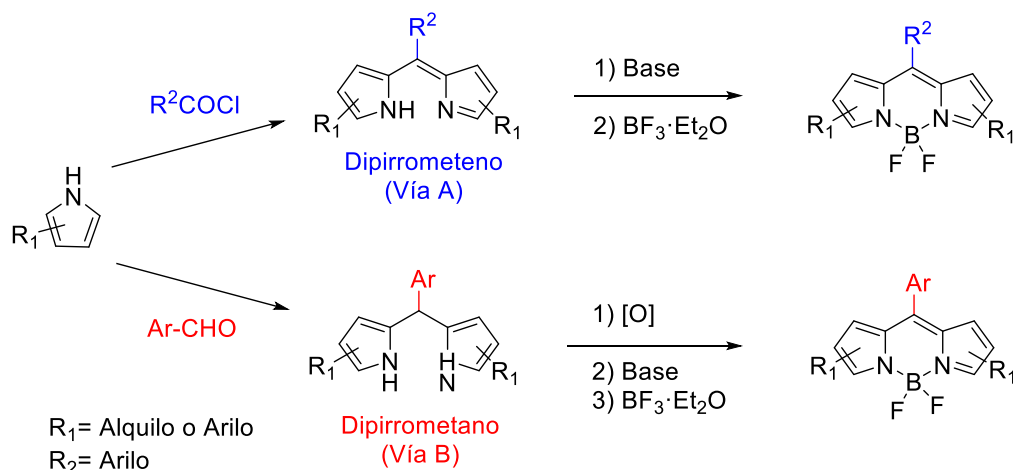
Existen en la actualidad dos estrategias generales para la preparación de BODIPYs simétricos que incorporan sustituyentes arilo sobre la posición C-8: (a) la aproximación de Lindsey, que emplea como material de partida cloruros de ácido o aldehídos aromáticos como precursores del sustituyente arilo y (b) la aproximación de Peña-Cabrera, en la que se efectúa una reacción de acoplamiento de Liebeskind-Srogl, catalizada por paladio (dónde el sustituyente arilo del BODIPY procede de un ácido borónico aromático) como elemento clave de la estrategia.

i) Aproximación de Lindsey.

Esta aproximación se basa en la condensación de aldehídos aromáticos²⁴¹ (o alternativamente cloruros de ácido²⁴²) con pirroles para originar dipirrometenos (tras una etapa de oxidación de los dipirrometanos intermedios en el caso de usar aldehídos o directamente cuando se emplean cloruros de ácido) que son posteriormente convertidos en BODIPYs por complejación con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en presencia de una amina terciaria (Esquema 53). Esta estrategia constituye sin duda el procedimiento más extendido y más ampliamente utilizado para la síntesis de BODIPYs, aunque la etapa de oxidación puede complicar el procedimiento experimental y comprometer el tipo de estructuras sobre el que puede ser empleado.

²⁴¹ a) Rao, P. D.; Dhanalekshmi, S.; Littler, B. J.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 7323–7344. b) Littler, B. J.; Miller, M. A.; Hung C. H.; Wagner R. W.; O'Shea D. F.; Boyle P. D., Lindsey J. S. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 1391-1396. c) Clausen, C.; Gryko, D. T.; Yasseri, A. A.; Diers, J. R.; Bocian, D. F.; Kuhr, W. G.; Lindsey, J. S., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 7371-7378. d) Laha, J. K.; Dhanalekshmi, S.; Taniguchi, M.; Ambroise, A.; Lindsey, J. S., *Org. Process Res. Dev.*, **2003**, 7, 799-812. e) Gryko, D.; Lindsey, J. S., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 2249-2252. f) Boyle, R. W.; Brückner, C.; Posakony, J.; James, B. R.; Dolphin, D.; *Org. Synth.*, **1999**, 76, 287-291.

²⁴² Burghart, A.; Kim, H.; Welch, M. B.; Thoresen, L. H.; Reibenspies, J.; Burgess, K.; Bergstrom, F.; Johansson, L. B. A. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 7813–7819.



Esquema 53. Síntesis de BODIPYs sustituidos en C-8 mediante condensación de pirroles con:
 A) cloruros de ácido y B) aldehídos.

Un ejemplo de esta estrategia para la preparación de BODIPYs sustituidos en C-8 con rotación restringida lo constituye el trabajo de Nagano y colaboradores,²⁴³ en el que emplearon una serie de aldehídos para la síntesis de una librería de C8-aril BODIPYs con sustituyentes en posición *orto*. La ruta les permitió el acceso a una amplia variedad de derivados pero no resultó demasiado eficiente en cuanto a rendimiento químico global (los rendimientos que oscilan entre el 7 y el 30%). Por otro lado, algunos de los aldehídos de partida empleados tuvieron que ser previamente sintetizados ya que no eran comercialmente asequibles.

Esta estrategia requiere el empleo de grupos funcionales compatibles con las condiciones de reacción (alquilo, arilo, éter, nitro). En este contexto, la preparación de los derivados **167** y **169**, que contienen un grupo amino, implican la reducción del nitro derivado correspondiente.

El inconveniente, por tanto, de esta ruta aplicada a nuestros objetivos sería el proceso de postfuncionalización necesario para generar un grupo reactivo que permitiese la conjugación a otras moléculas (Figura 24).

²⁴³ Sunahara, H.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 5597–5604.

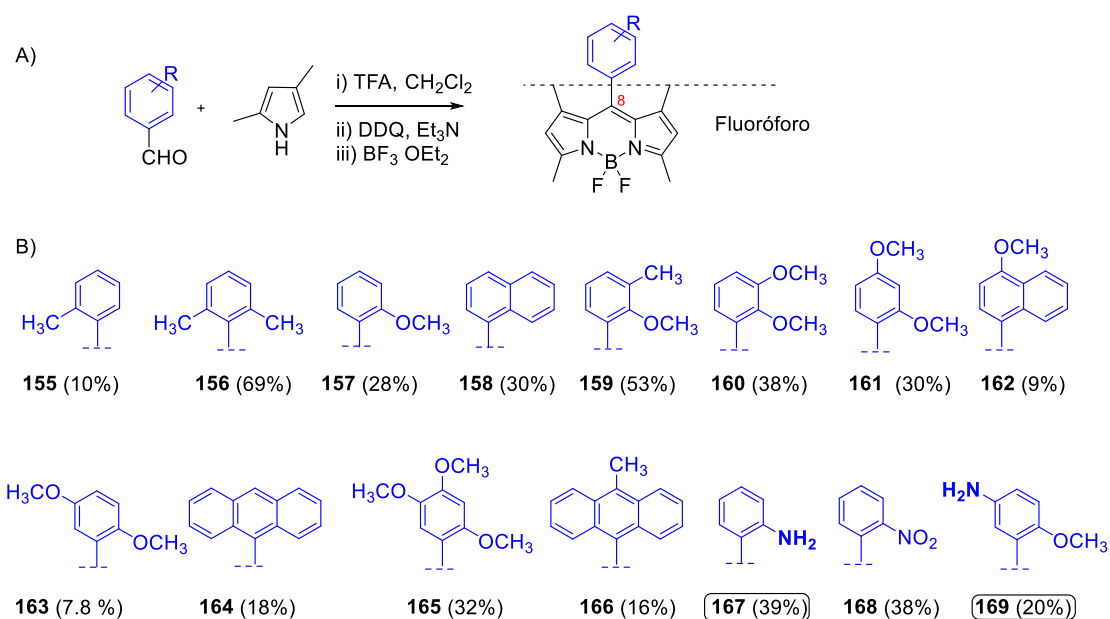
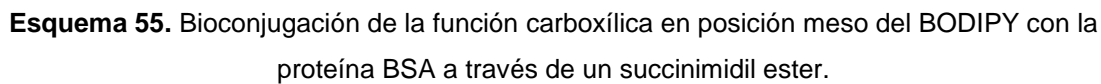
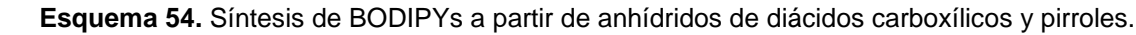


Figura 24. Síntesis de derivados BODIPYs *meso* aril-sustituídos y rendimientos.

Como una extensión de esta estrategia, en el año 2009 se describió la condensación directa de anhídridos de diácidos carboxílicos con pirroles.²⁴⁴ La aplicación de esta estrategia al anhídrido ftálico **171** permitió la obtención de producto aril-sustituído en C-8 con un 26% de rendimiento.

Esta metodología, conduce a la formación de un BODIPY *meso* sustituido con una función carboxilo adicional, que puede ser empleada para su conjugación con biomoléculas. De hecho los ácidos carboxílicos **172** y **173** con sustituyentes alquílicos en la posición C-8 fueron conjugados con la proteína de BSA (albúmina de suero bovino, siglas en inglés) vía los correspondientes succinimidil ésteres (Esquema 55).

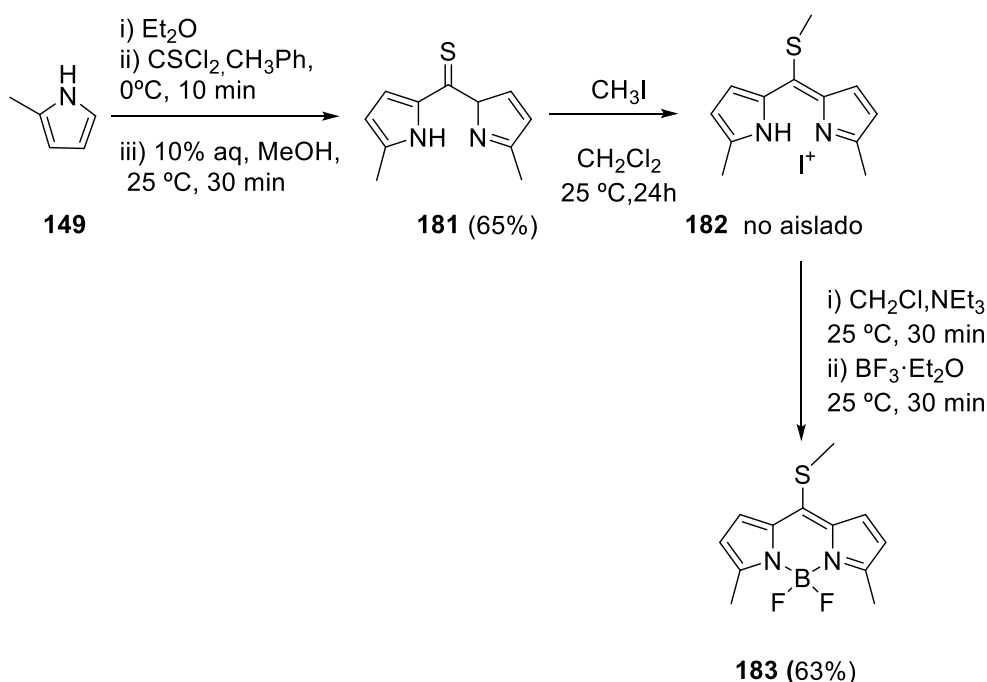
²⁴⁴ Wang, D.; Fan, J.; Gao, X.; Wang, B.; Sun, S.; Peng, X. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 7675–7683.



106

ii) Aproximación de Peña-Cabrera

A diferencia de la aproximación anterior, el método de Peña-Cabrera, para la preparación de BODIPYs aril sustituidos en C-8, con sustituyentes en posición *orto*, se basa en una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por Pd de un ácido aril borónico sobre un BODIPY ya preformado (**183**). Este último, el 8-tiometil-BODIPY **183**, descrito por Biellman²⁴⁵ se prepara por reacción de tiofosgeno con 2-metilpirrol (**149**) para generar una dipirrotiocetona intermedia **181**, que es sometida a una reacción de alquilación con yoduro de metilo originando el derivado **182**, que es convertido en el BODIPY **183** por tratamiento con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y una amina terciaria.

Esquema 56: Síntesis de 8-tiometil-BODIPY **183**

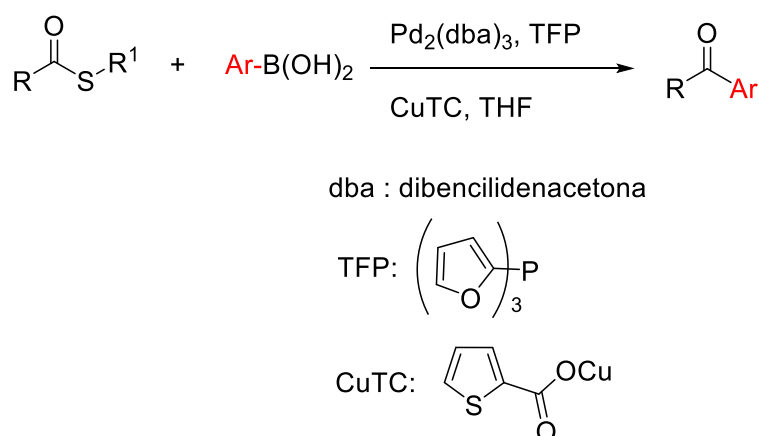
El grupo de Peña-Cabrera pudo demostrar que la presencia del núcleo de BODIPY, deficiente en electrones, en el 8-tiometil-BODIPY **183**, conlleva una activación de la funcionalidad tioeter de manera tal que puede participar en acoplamientos catalizados por paladio del tipo de Liebeskind-Srogl²⁴⁶ del que son sustratos habituales los esteres de tioles.²⁴⁷ En general, la reacción de acoplamiento cruzado de Liebeskind-

²⁴⁵ Goud, T. V.; Tutar, A.; Biellmann, J. F., *Tetrahedron*, **2006**, 62, 5084-5091.

²⁴⁶ a) Yang, H.; Hao, L.; Wittenberg, R.; Egi, M.; Huang, W.; Liebeskind, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1132-1140. b) Wittenberg, R.; Srogl, J.; Egi, M.; Liebeskind, L. S. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3033-3035. c) Liebeskind, L. S.; Srogl, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11260-11261.

²⁴⁷ Peña-Cabrera, E.; AguilarAguilar A.; Gonzalez-Dominguez, M.; Lager, E.; Zamudio-Vazquez, R.; Godoy-Vargas, J.; Villanueva-Garcia, F. *Org. Lett.* **2007**, 9, 4163-4166.

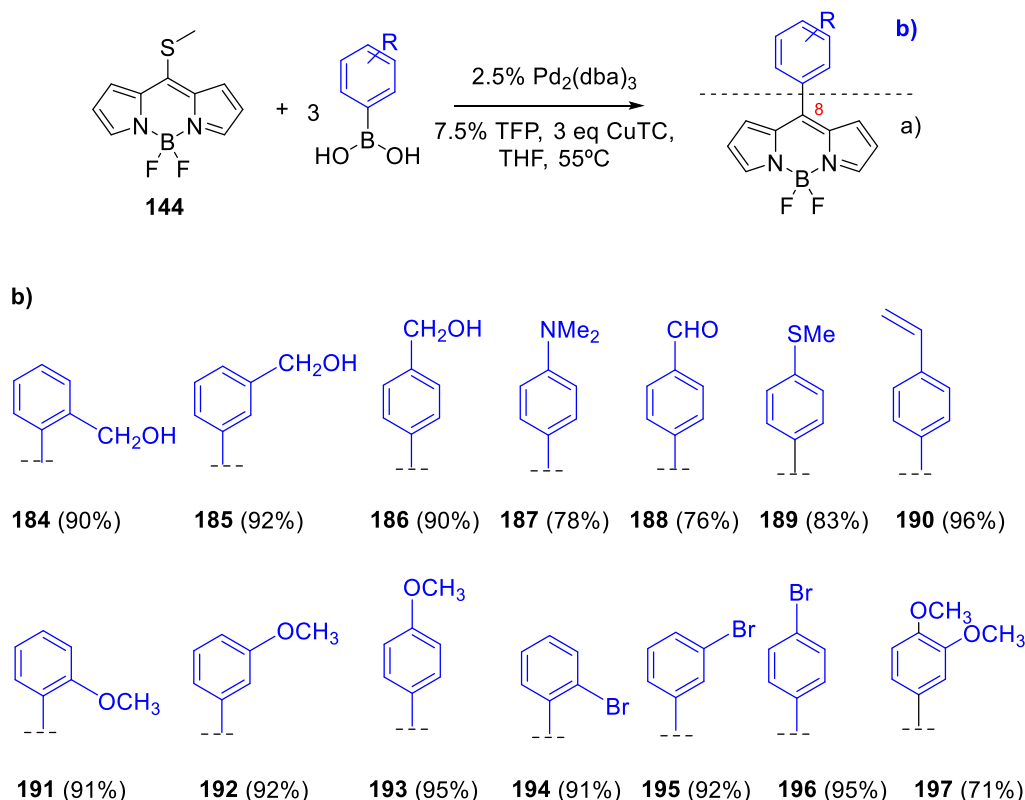
Srogl se lleva a cabo además en presencia de un co-catalizador de Cu y de una fosfina (Esquema 57).



Esquema 57. Acoplamiento de Liebeskind-Srogl entre un tiol ester y un ácido borónico.

De acuerdo con esto, Peña-Cabrera y col. utilizaron el acoplamiento cruzado de Liebeskind-Srogl para generar un conjunto de BODIPYs sustituidos en la posición meso con excelentes rendimientos (Esquema 58). En esta metodología, las condiciones de reacción son muy suaves y por tanto compatibles con un buen número de funcionalidades, de tal manera que se pueden generar una amplia variedad de BODIPYs diferentemente sustituidos en C-8. En el Esquema 58 se muestran algunos de los productos sintetizados por el grupo de Peña-Cabrera. Los hidroximetil derivados **184**, **185** y **186**, fueron preparados recientemente mediante esta metodología por Peña-Cabrera y Pannell.²⁴⁸

²⁴⁸ Roacho, R. I.; Metta-Magaña, A. J.; Peña-Cabrera, E.; Pannell, K. H. *J. Phys. Org. Chem.*, **2013**, 26, 345-351.



Esquema 58. Síntesis de BODIPYs meso aril sustituidos a partir del BODIPY de Biellman mediante el acoplamiento cruzado de Liebeskind-Srogl.

Más recientemente, otros grupos de investigación han extendido este tipo de química a 8-cloro-BODIPYs, describiendo reacciones de acoplamiento cruzado tipo Suzuki, Stille, Heck, o Sonogashira, etc, catalizadas por metales de transición.²⁴⁹

De todos estos compuestos, cabe destacar por su relevancia en cuanto al trabajo planteado en esta Memoria, el derivado **184** (Esquema 58) que incorpora un residuo de *orto*-hidroximetilfenilo en C-8.²⁵⁰ Este compuesto reunía los requisitos que habíamos previsto inicialmente: a) un sustituyente *orto*- en el anillo aromático que conduciría a un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia, y b) un punto de anclaje (grupo hidroximetilo) adecuado para su combinación con diferentes moléculas y para posteriores modificaciones químicas. En particular, estábamos interesados también en derivados de BODIPY C-8 arilados con un grupo azido-metil en *orto* que podrían, en principio, ser preparados a partir de derivados tipo **184**.

²⁴⁹ a) Leen, V.; Yuan, P.; Wang, L.; Boens, N.; Dehaen W. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6150–6153. b) Dhokale, B.; Jadhav, T.; Mobin, S. M.; Misra, R. *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 9119-9121. c) Zhao, N.; Vicente, M. G. H.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 6181-6192.

²⁵⁰ Roacho, R. I.; Metta-Magaña, A. J.; Peña-Cabrera, E.; Pannell, K. H. *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, *26*, 345–351.

Por estas razones, elegimos BODIPYs C-8 arilados con un grupo *orto* hidroximetilo, como nuestros productos de partida.

Sin embargo, a la hora de plantearnos el acceso a cantidades importantes de este compuesto mediante la metodología descrita por Peña-Cabrera, identificamos ciertos inconvenientes que detallamos a continuación:

- La secuencia global transcurre en tres etapas a partir de pirrol, con bajos rendimientos (alrededor del 20%).
- El tiofosgeno, que se requiere en la primera etapa de la síntesis, presenta una elevada toxicidad que desaconseja su utilización.
- La reacción de acoplamiento de Liebesking-Srogl, emplea reactivos de elevado coste que incluyen el catalizador (Pd_2dba_3), el co-catalizador (CuTC, 3 equiv.) y el ligando (TFP). (Precios Aldrich: 80 euros/g; 90 euros/g y 82 euros/g, respectivamente). Estos precios complican el acceso a cantidades importantes del BODIPY de partida.
- El ácido borónico requerido para el acoplamiento cruzado [ácido 2-(hidroximetil)fenil borónico], aunque es comercialmente asequible tiene un precio demasiado elevado como para ser empleado en cantidades de gramos (88.64 euros/50 mg, Aldrich España).

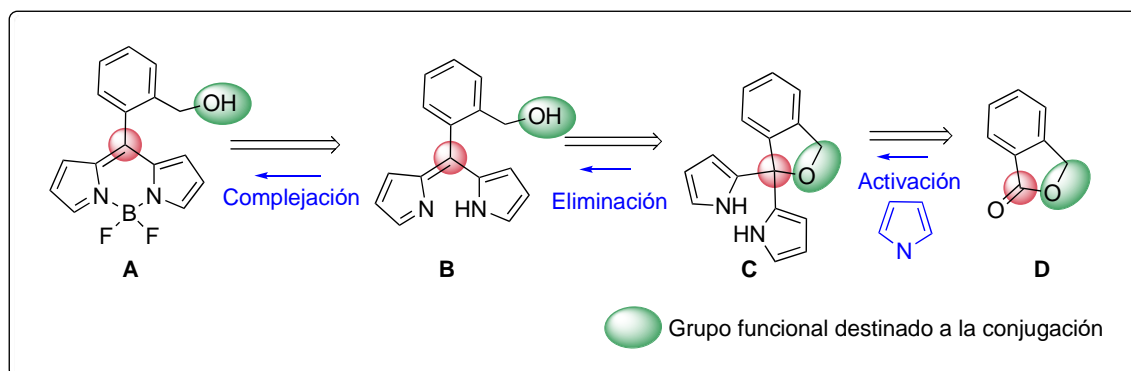
A la vista de estos antecedentes nos propusimos como objetivo el desarrollar un método alternativo, conciso y eficiente que nos permitiera la obtención de 8-(*ortohidroximetil*)aril-BODIPYs, que se pudiera realizar en escala de gramos, y que mejorara los inconvenientes de los métodos de síntesis que acaban de ser comentados.

II.3.2. Resultados y Discusión

II.3.2.1. Síntesis de 8-(*ortohidroximetil*)aril-BODIPYs

Nuestro diseño retrosintético se muestra en el Esquema 59 y se basó en emplear ftalidas, **D**, como materiales de partida con la idea de que la función carbonilo de la lactona fuera el precursor del carbono C-8 del BODIPY, y que el proceso de apertura de la lactona (**C**→**B**, Esquema 59) generase directamente el grupo hidroximetilo deseado.

El aspecto crítico a resolver en esta estrategia era cómo lograr la activación de la lactona aromática frente a un reactivo de nucleofilia moderada como es el pirrol. De transcurrir con éxito, la adición de dos moléculas de pirrol sobre la función carbonilo (**D**→**C**, Esquema 59) generaría un intermedio de tipo dipirrometano espiránico **C**, que por una reacción de eliminación originaría el dipirrometano **B**, precursor del BODIPY **A**.



Esquema 59. Diseño retrosintético de un BODIPY tipo **A**.

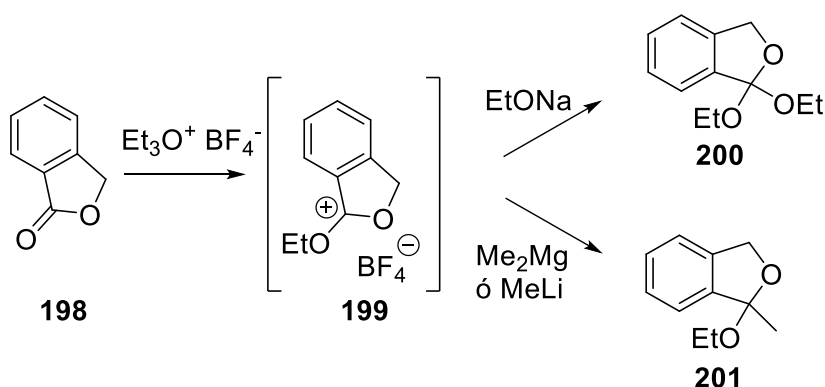
De acuerdo con estas premisas, nuestra ruta sintética comenzó con el tratamiento de la ftalida **198** con el tetrafluoroborato de trietiloxonio, ya que Meerwein y colaboradores habían observado que este reactivo es capaz de transferir un catión etilo a diferentes ftalidas para generar cationes de tipo de dialcoxicarbenio, p. ej. **199** (Esquema 60).²⁵¹ Esta reacción transcurre con bastante facilidad a temperatura ambiente y este proceso se ha empleado para la determinación de las basicidades de distintas lactonas y ésteres (mediante el análisis por RMN de las velocidades relativas de reacción de frente al catión trietiloxonio).²⁵² Desde un punto de vista sintético, este proceso se ha utilizado para la conversión de lactonas a ortoésteres,²⁵³ o a cetales,²⁵⁴ por posterior reacción de la sal de tetrafluoroborato de dialcoxicarbenio con alcóxidos o alquilmetales.

²⁵¹ a) Meerwein, H.; Borner, P.; Fuchs, O.; Jurgensasse, H.; Schrod, H.; Spille, J. *Chem. Ber.*, **1956**, 89, 2060-2079. b) Meerwein, H.; Bodenbenner, K.; Borner, P.; Kunert, F.; Wunderlich, K. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1960**, 632, 38-55.

²⁵² Wiberg, K. B.; Waldron, R. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7705-7709.

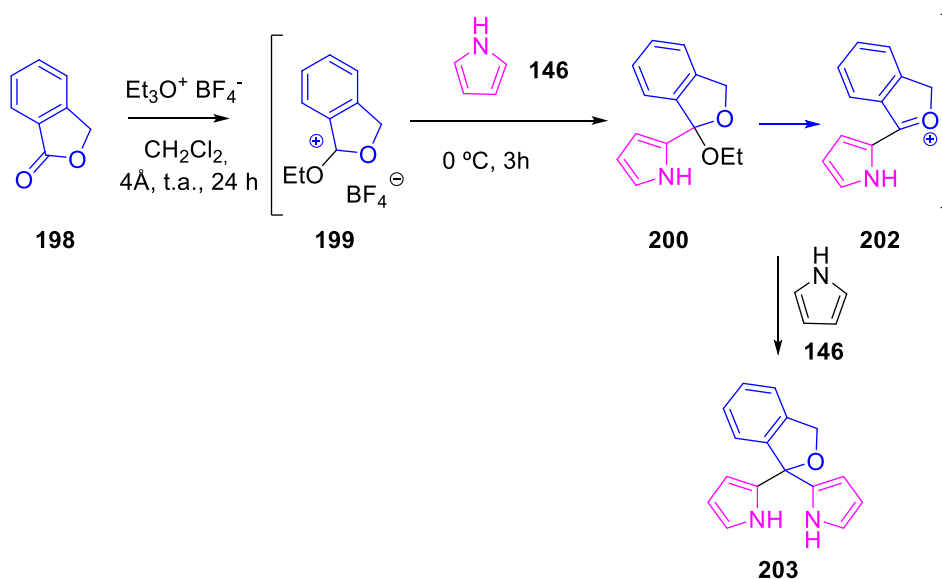
²⁵³ Chapleo, C.; Hallett, P.; Lythgoe, B.; Waterhouse, I.; Wright, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.*, **1977**, 1211-1218.

²⁵⁴ Tobia, D.; Baranski, J.; Rickborn, B. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4253-4256.



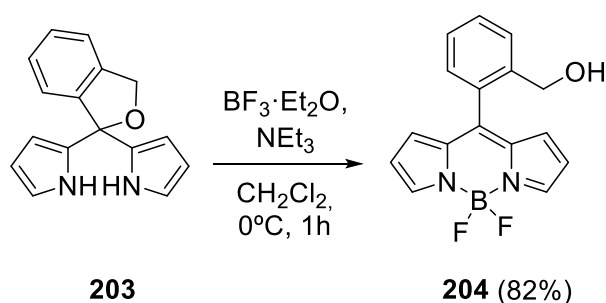
Esquema 60. Reacción de ftalida **198** con la sal de Meerwein.

A la vista de estos antecedentes, y a pesar de la diferencia de nucleofilia existente entre estos reactivos y pirrol, decidimos llevar a cabo el tratamiento de la ftalida **198** con tetrafluoroborato de trietiloxonio en presencia de tamices moleculares (4Å) para generar el catión **199**, y tras 24 h de reacción se añadió un exceso de 1H-pirrol **146** (10 equiv.) (Esquema 61). Una vez transcurridas tres horas de reacción se procedió a su elaboración y se sometió a purificación por cromatografía. Se pudo así constatar la formación de un nuevo producto de reacción acompañado de ftalida. La separación de ambos compuestos sólo se logró mediante cromatografía en capa fina de tipo preparativo. La estructura del nuevo producto de reacción, **203**, se confirmó de forma inequívoca en base a: *i*) la observación de un pico a 251.1178 en el espectro de masas y coincidente con $(\text{M}+\text{H})^+$, *ii*) el patrón de señales características del anillo de pirrol ($\delta_{\text{H}} = 5.86, 6.07$ y 6.69 ppm y cada una de ellas integrando por 2H) en el espectro de ^1H -RMN, y *iii*) la presencia de dos señales una a $\delta_{\text{C}} = 85.5$ ppm y otra a $\delta_{\text{C}} = 71.0$ ppm atribuibles al carbono cuaternario y al CH_2 bencílico del ftalano **203**, respectivamente, en el espectro de ^{13}C -RMN.



Esquema 61: Reacción de ftalida (**198**) con pirrol en presencia de sal de Meerwein.

El mecanismo de reacción propuesto para esta transformación implica la reacción inicial del catión **199** con un equivalente de pirrol **146** para formar el cetel intermedio **200**, que debe evolucionar hacia un nuevo catión oxonio **202**, el cual reacciona con una segunda unidad de pirrol **146** para originar el dipirrometano intermedio **203**. Este intermedio es clave en nuestro diseño ya que debería generar un derivado de dipirrometeno mediante una reacción de eliminación. De hecho, cuando el compuesto **203** fue tratado con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y Et_3N en CH_2Cl_2 a 0 °C, se apreció la formación de un material, que resultó fluorescente y al cual se pudo asignar la estructura del BODIPY deseado, **204** (Esquema 62). En este proceso sintético tiene lugar la apertura del éter cíclico vía eliminación, y la formación simultánea del compuesto de coordinación entre el boro y los átomos de nitrógeno de los anillos de pirrol.



Esquema 62: Síntesis de 8-(*orto*-hidrometil)fenil BODIPY **204**.

Una vez comprobado el éxito del procedimiento de síntesis propuesto y con el fin de evitar las pérdidas de rendimiento asociadas a la purificación del dipirrometano

intermedio, se decidió llevar a cabo las tres etapas de formación del BODIPY (**198**→**199**→**203**→**204**, Esquemas 61 y 62) de forma consecutiva en un único matraz de reacción. Así, se trató la ftalida **198** con $\text{BF}_4^- \cdot \text{Et}_3\text{O}^+$ en presencia de tamices moleculares y tras 24 horas, se adicionó el pirrol a 0 °C. Tras 3 horas de reacción a temperatura ambiente, se reenfrío el matraz de reacción (0 °C) y se trató con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y Et_3N . La elaboración de la reacción, seguida de purificación cromatográfica permitió obtener el BODIPY **204** con un rendimiento del 26%, muy similar al que se había obtenido con el procedimiento en tres etapas.

A continuación, una vez demostrada la viabilidad de esta metodología para el caso estudiado, se decidió evaluar la extensión de esta estrategia al empleo de otros pirroles y ftalidas. En el caso de tener éxito, esta estrategia permitiría la obtención de una amplia variedad de derivados de BODIPYs, con rotación restringida, y con una funcionalidad adecuada para su conjugación a otras moléculas, y a partir de productos de partida comercialmente asequibles y de precios razonables.

De este modo, comenzamos seleccionando dos nuevos pirroles comerciales: 2,4-dimetil-1H-pirrol **134**, y 2,4-dimetil-3-etil-1H-pirrol **205** como productos de partida (Figura 25). La utilización de estos pirroles presenta *a priori* algunas ventajas sobre el 1H-pirrol **146**: *i*) al disponer una única posición reactiva frente a la sustitución electrófila aromática (C-5) los procesos de polimerización habitual se minimizan, y las reacciones transcurrirán con mayor rendimiento global, *ii*) al estar presente un metilo en C-4 del pirrol, los BODIPYs generados presentarán una restricción al giro muy superior que al de los derivados sin sustituir y por tanto sería de esperar un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y *iii*) la presencia de sustituyentes en C-3 en el pirrol **205** conlleva un ligero desplazamiento batocrómico de las bandas espectrales del BODIPY por el efecto inductivo dador de los grupos alquilo, permitiendo la preparación de BODIPYs que emitan a diferentes longitudes de onda.

Alternativamente, también decidimos evaluar el empleo de dipirrol **206** en esta estrategia. Este compuesto (**206**) fue sintetizado según un procedimiento descrito en la literatura mediante el tratamiento de pirrol con bis(trifluoroacetoxi)iodobenceno y TMSBr (Figura 25).²⁵⁵

²⁵⁵ Dohi, T.; Morimoto, K.; Maruyama, A.; Kita, Y. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 2007–2010.

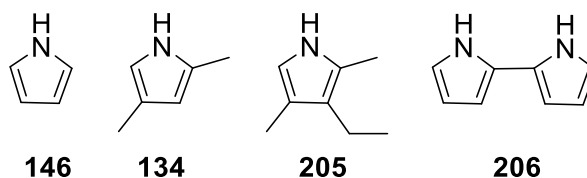


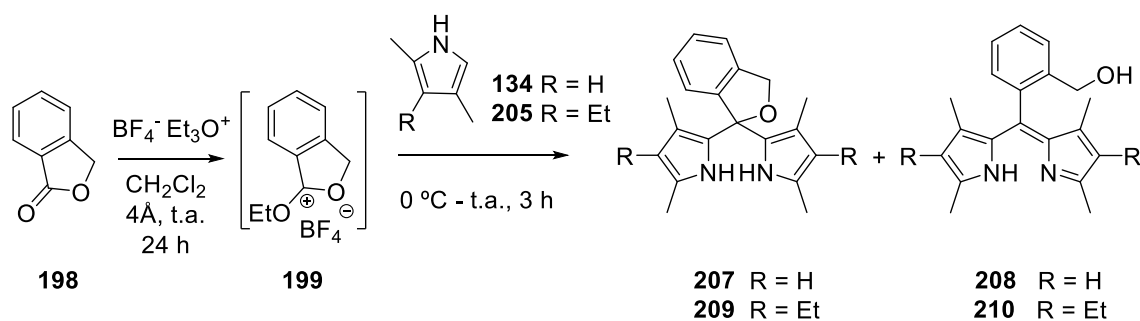
Figura 25: Pirroles seleccionados

Una vez seleccionados los nuevos pirroles **134**, **205** y **206**, se procedió a ensayar las condiciones de reacción que habían sido aplicadas a **146**. Así pues, el catión **199** obtenido *in situ* por reacción de ftalida **198** con tetrafluoroborato de trietiloxonio ($\text{BF}_4 \cdot \text{Et}_3\text{O}$) en CH_2Cl_2 y durante 24 horas, se trató a 0°C y de forma independiente con los pirroles **134** y **205** (3 equivalentes) (Esquema 63). Tras tres horas de reacción, en ambos casos se observó la formación de dos nuevos productos que no resultaron ser demasiado estables pero que en base a sus espectros de ^1H -RMN, de masas, y a su comportamiento químico, les asignamos la estructura de dipirrometanos **207** y **209** y los correspondientes dipirrometenos ó dipirrinas **208** y **210**,²⁵⁶ generados en un proceso de eliminación con apertura del anillo y formación del doble enlace tetrasustituído (Esquema 63). La mayor congestión estérica en los dipirrometanos sustituidos **207** y **209**, comparados con el análogo sin sustituir **206** (Esquemas 61 y 62), debe favorecer el proceso de eliminación ya que tras repetidas purificaciones cromatográficas del dipirrometano **207** (o **209**), siempre se detectaba la aparición de cantidades apreciables de dipirrometeno **208** (o **210**). Estos últimos tampoco resultaron ser demasiado estables, lo cual no es sorprendente si se tiene en cuenta que se ha documentado que el sistema sin sustituir es inestable en disolución por encima de -40°C ,²⁵⁷ y que su elevada reactividad explica la facilidad con la que estos compuestos forman complejos neutros con una variedad de metales (incluyendo el átomo de Boro como en el caso de los BODIPYs).²⁵⁸

²⁵⁶ Fischer, H.; Orth, H. *Die Chemie des Pyrrols*; Akademische Verlagsgesellschaft: Leipzig, **1937**, vol. II.

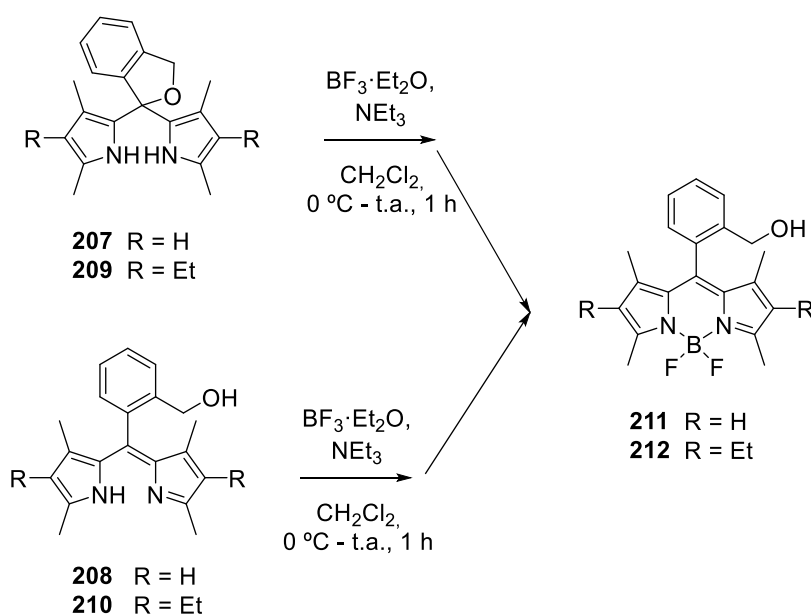
²⁵⁷ Van Koevinge, J. A.; Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1977**, 96, 55-58.

²⁵⁸ Wood, T. E.; Thompson, A. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 1831-1861.



Esquema 63. Reacción de ftalida con los pirroles **134** y **205**.

Esta hipótesis fue corroborada cuando tanto las fracciones enriquecidas en dipirrometanos **207** (o **209**) o en dipirrinas **208** (o **210**) fueron tratadas de forma independiente con $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ y Et_3N . En todos los casos y con independencia del material de partida empleado, **207** y **209** o **208** y **210**, se obtuvieron exclusivamente los derivados de BODIPYs esperados **211** o **212** como productos de reacción (Esquema 64).



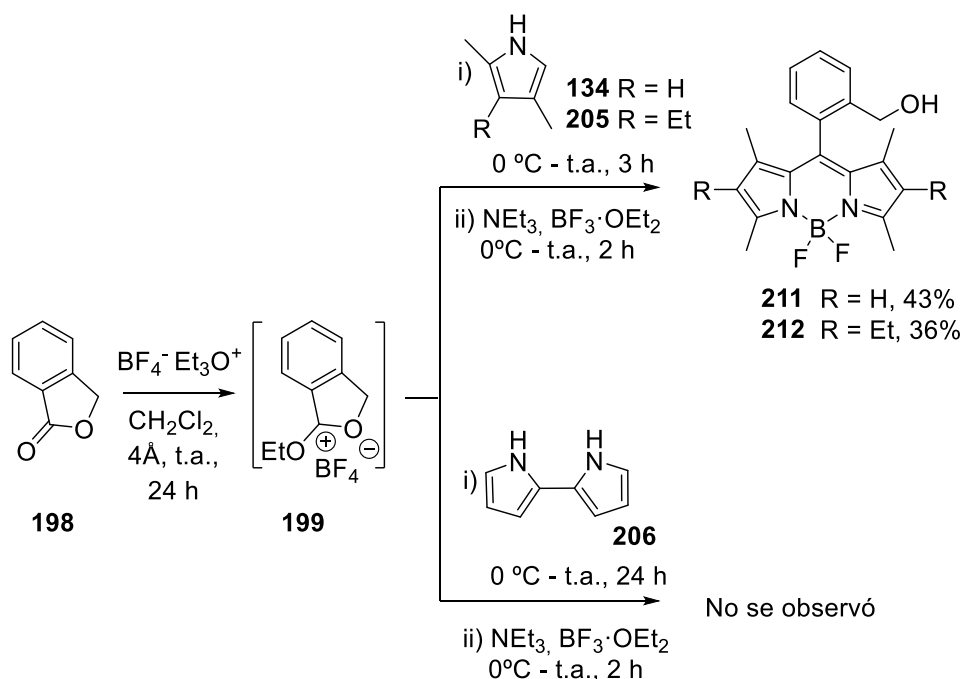
Esquema 64. Síntesis de BODIPYs **211** y **212** a partir de dipirrometanos **207** (o **209**) o dipirrometanos **208** (o **210**).

En base a estos resultados obtenidos, pensamos que estaba especialmente indicado llevar a cabo la síntesis de BODIPYs sin aislar ninguno de los intermedios de reacción. Así, se trató la ftalida **198** con la sal de Meerwein y tras 24 h se añadió el pirrol correspondiente (**134** o **205**) (0 °C) (Esquema 65). Tras tres horas de reacción a temperatura ambiente, ésta se reenfría a 0 °C y se adicionan directamente $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ y Et_3N . Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se

obtuvieron los BODIPYs correspondientes, **211** y **212** con rendimientos globales del 43 y 36%, respectivamente. Si bien, estos rendimientos pueden parecer moderados, son mejores o comparables a los reportados en la literatura empleando métodos de síntesis de BODIPYs existentes, y que han sido comentados en la Introducción.

Es importante destacar que en el caso de los pirroles sustituidos **134** y **205**, que son menos reactivos frente a la reacción secundaria de polimerización, aunque de mayor coste que el 1H-pirrol, pudimos reducir la cantidad de pirrol a tres equivalentes (en el caso de pirrol se emplean 10 equivalentes). También pudimos comprobar que un mayor número de equivalentes de pirrol no aporta mejoras apreciables en el rendimiento.

Por otro lado, la reacción análoga del bispirrol **206**, sintetizado en el laboratorio, no condujo al BODIPY esperado, observándose la formación de materiales de baja solubilidad y posiblemente de naturaleza polimérica (Esquema 65).



Esquema 65: Síntesis one-pot de los BODIPYs **211** y **212**.

Con el fin de ampliar el número de BODIPYs accesibles por esta estrategia nos centramos en el empleo de diferentes ftalidas como material de partida (Figura 26). En este contexto, se optó por utilizar 5-bromoftalida **213**, y 6-nitroftalida **214**, comercialmente disponibles como representantes de sistemas aromáticos con sustituyentes levemente y fuertemente atractores de electrones. Como ejemplos de

ftalidas ricas en electrones recurrimos a 4,5,6-trimetoxiftalida **215**,²⁵⁹ y 7-(clorometil)-4,5,6-trimetoxisobenzofuran-1(3H)-ona **216**,²⁶⁰ que fueron sintetizadas en el laboratorio mediante protocolos descritos en la literatura y que incluían la formilación (HCHO, HCl) del ácido eudésmico.

La presencia de un átomo de bromo en la ftalida **213** presenta la ventaja de que puede facilitar el acceso a BODIPYs diferentemente funcionalizados, ya que al tratarse de un haluro de arilo se hacen posible la utilización de reacciones de formación de enlaces-carbono-carbono catalizadas por paladio. Dichas reacciones podrían ser llevadas a cabo bien directamente en la bromo-ftalida de partida (**213**) o después de la construcción del núcleo de BODIPY. Como ejemplo de esta primera estrategia, la 5-bromoftalida **213** se sometió a una reacción de acoplamiento de tipo Sonogashira²⁶¹ con fenilacetileno para obtener 5-(2-feniletinil)ftalida **217** (Figura 26).²⁶²

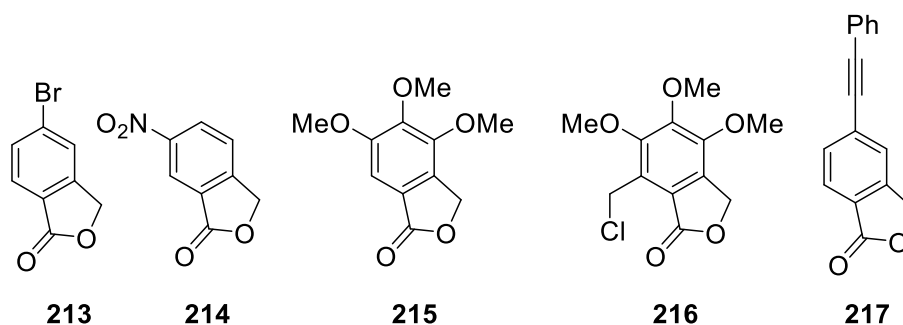


Figura 26: Ftalidas empleadas en síntesis de BODIPYs.

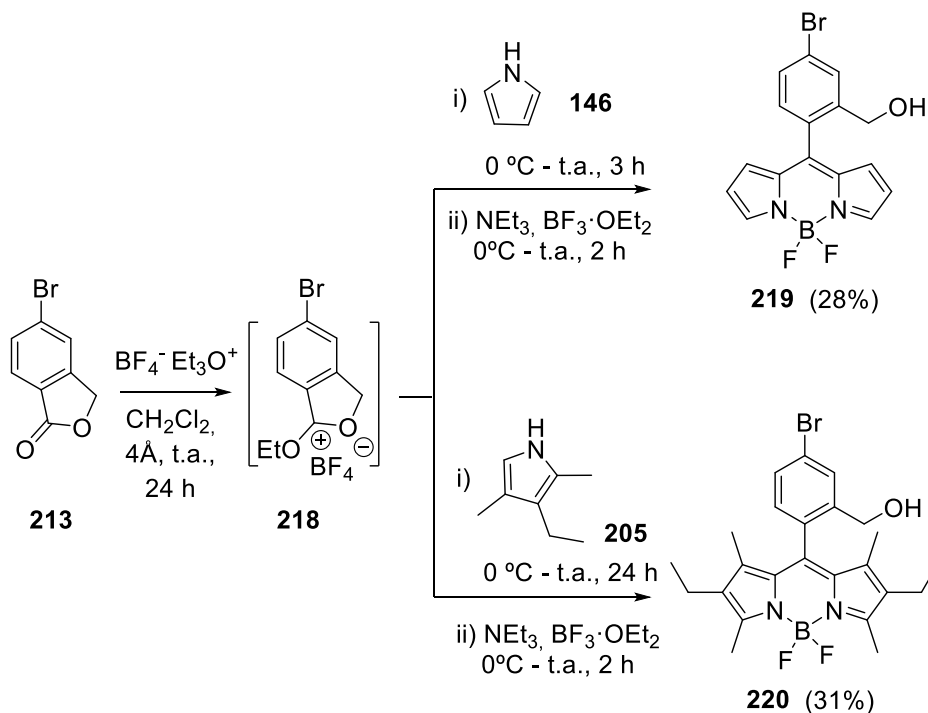
Una vez obtenidas estas ftalidas (Figura 26), se procedió a ensayar su reacción con los pirroles mencionados anteriormente. Así, la reacción entre la ftalida **213** con los pirroles **146** y **205**, en las condiciones one-pot descritas anteriormente, condujo a la formación de los BODIPYs **219** y **220**, respectivamente, con rendimientos moderados (Esquema 66).

²⁵⁹ Kermack, W. O.; Weatherhead, A.P.; O'Farrell Walsh, E.; King, F. E.; King, T. J. *J. Chem. Soc.*, **1942**, 726-727.

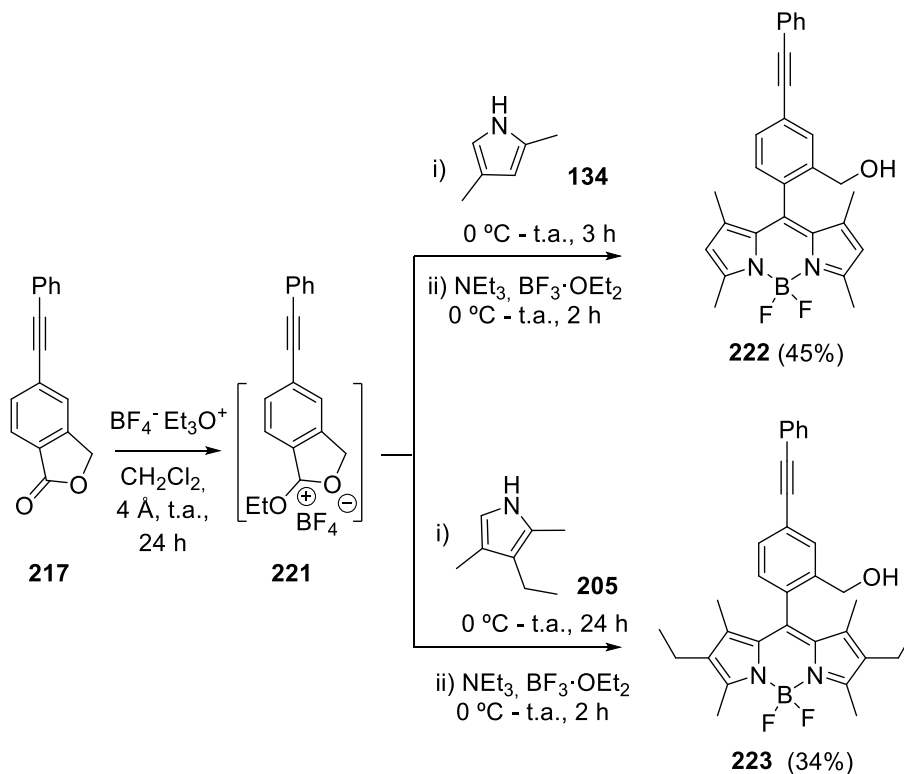
²⁶⁰ Ellerbrock, P.; Armanino, N.; Trauner, D. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, 53, 13414-13418.

²⁶¹ a) Sonogashira, K. T.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 16, 4467-4470. b) Chinchilla, R.; Najera, C. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 874-922.

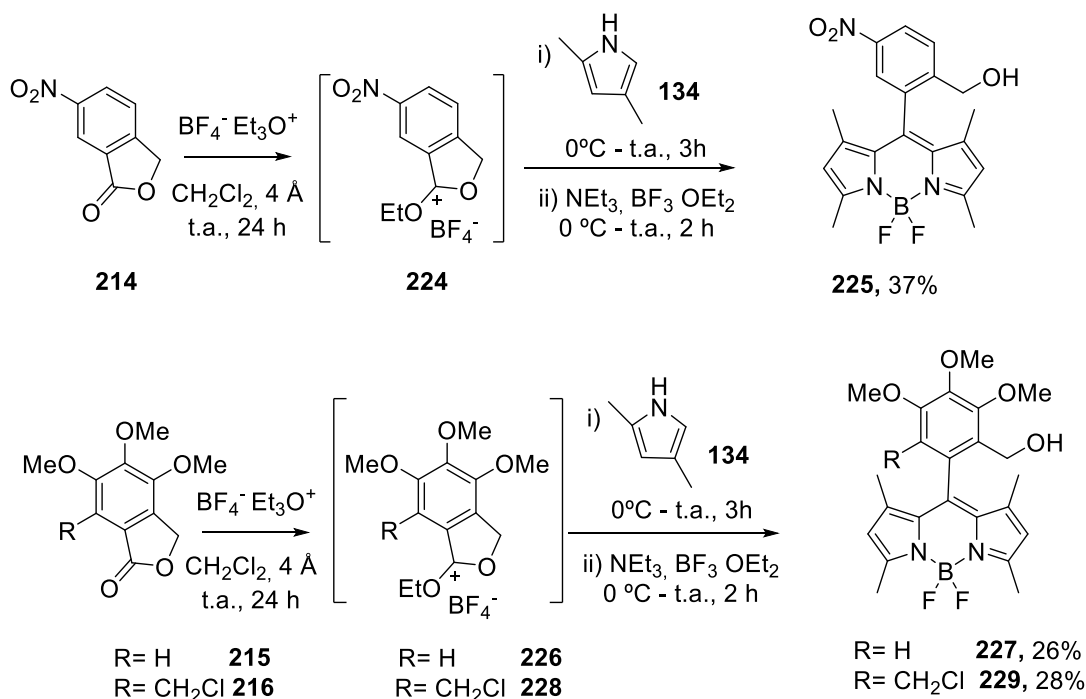
²⁶² Yanai, H.; Taguchi, T. *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 8967-8969.

Esquema 66. Síntesis one-pot de los BODIPYs **219** y **220**.

Por otro lado se ensayó la reacción de ftalida **217** con los pirroles **134** y **205**, en las mismas condiciones one-pot ya descritas. Análogamente, se pudieron obtener los BODIPYs **222** y **223** con rendimientos moderados. (Esquema 67).

Esquema 67. Síntesis one-pot de los BODIPYs **222** y **223**.

Un último aspecto de interés era el efecto que la presencia de sustituyentes de variada densidad electrónica en el anillo de ftalida tendría en la reacción de formación de BODIPYs. En función del curso de reacción propuesto, era previsible que la reacción de activación de la ftalida por la sal de Meerwein se viese facilitada en sistemas aromáticos ricos en electrones, como los portadores de grupos metoxilo, y debilitada en sistemas con sustituyentes atractores de electrones, como el grupo nitro. Estos efectos deberían ser los contrarios en la etapa posterior, dado que implica la reacción del catión (e.g. **224**, **226**, **228**, Esquema 68) con el pirrol. Para tener una idea de tolerancia de la reacción a los efectos electrónicos, se repitieron las mismas condiciones de activación y con los mismos tiempos de reacción con las ftalidas **214** (nitro), **215** (trimetoxi) y **216** (clorometiltrimetoxi) en presencia de 2,4-dimetilpirrol **134**. Tras tratamiento con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y Et_3N se pudieron obtener los BODIPYs **225**, **227** y **229**, respectivamente, con rendimientos similares a los del resto de casos analizados.



Esquema 68. Síntesis one-pot de BODIPYs a partir de ftalidas **214**, **215** y **216**.

Estos resultados nos permitieron concluir que la metodología propuesta permite la síntesis de una amplia variedad de BODIPYs sustituidos, en los que existe restricción de giro del grupo arilo en C-8, y que poseen un grupo hidroximetilo que *a priori* presenta la reactividad adecuada para su conjugación con moléculas o biomoléculas.

El método ha sido aplicado con éxito a la preparación de una gran variedad de derivados de BODIPYs con buenos rendimientos, y que se recogen en la Figura 27.

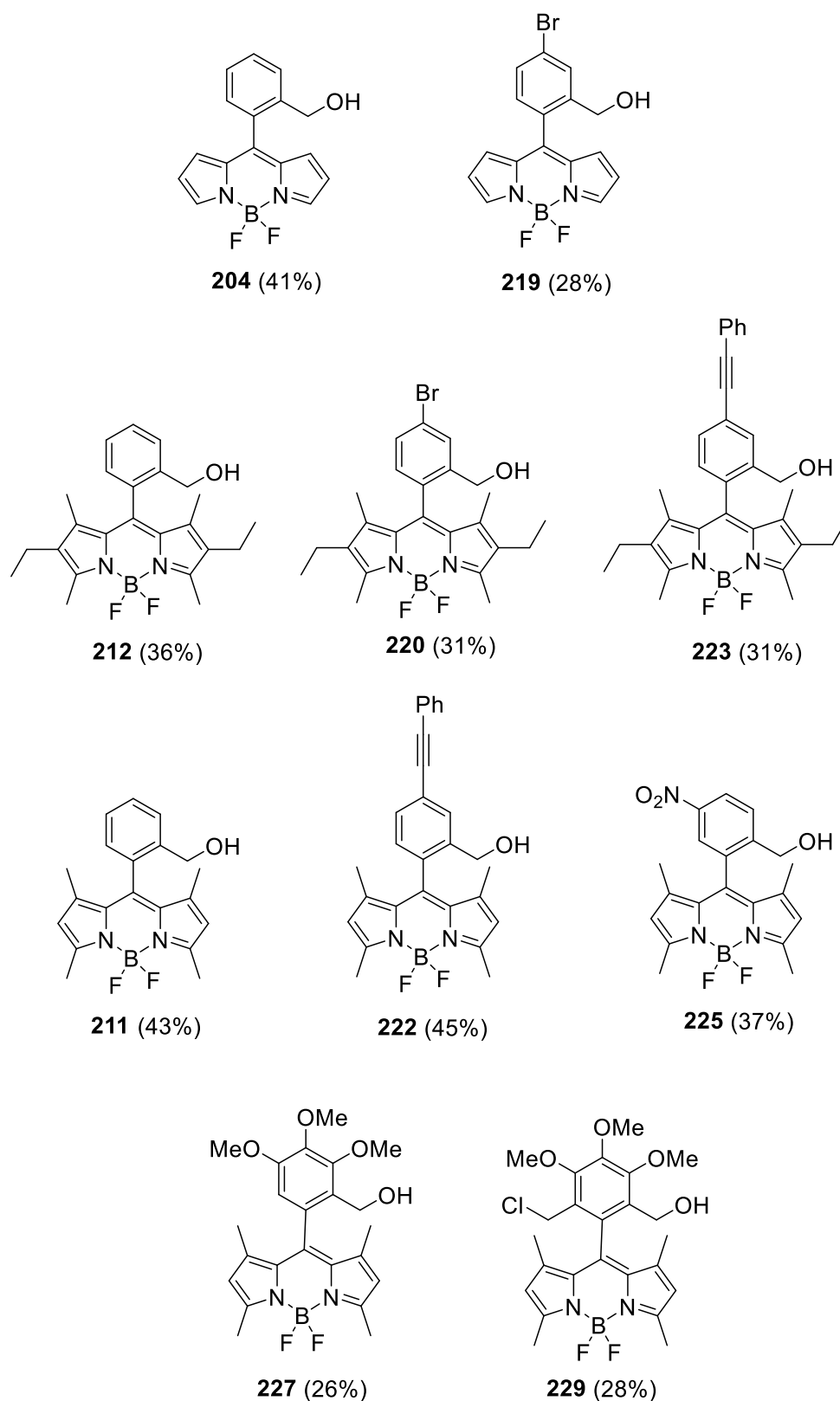


Figura 27. BODIPYs meso aril sustituidos preparados a partir de ftalidas.

II.3.2.2. Propiedades fotofísicas y comportamiento láser de los derivados de 8-C-*o*-hidroximetilfenil-BODIPYs

Al ser compuestos fluorescentes, la medida de las propiedades ópticas de los derivados de BODIPY sintetizados es de vital importancia. En éste sentido los correspondientes estudios fotofísicos y de comportamiento láser de los BODIPYs obtenidos fueron llevados a cabo en la Universidad del País Vasco (UPV) y en el Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR) del CSIC en Madrid por los grupos del Prof. Iñigo López-Arbeloa y la Dra. Inmaculada García, respectivamente.

Los datos de las propiedades fotofísicas de los sistemas **207**, **219**, **212**, **213** y **220** se recogen en la Tabla 7, comparados con los datos de los correspondientes derivados (misma sustitución en los anillos de pirrol) sin sustituyente aromático en posición meso **138**, **139** y **230** (Tabla 7, entradas *i*, *iv*, *vi*).

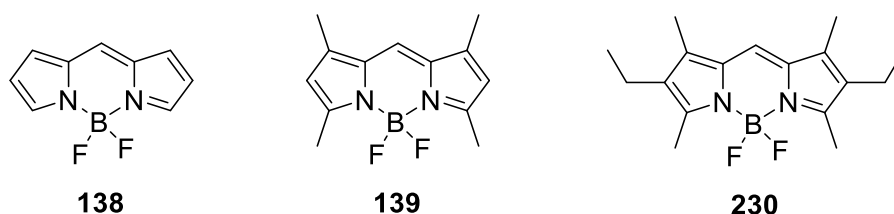


Figura 28. BODIPYs sin sustituyente en posición meso.

Tabla 7. Propiedades fotofísicas^[a] y propiedades láser^[b] de derivados de BODIPY.

Entrada	Bodipy	λ_{ab} (nm)	ϵ_{max}	λ_{fl} (nm)	$\Delta\nu_{st}$ (cm ⁻¹)	ϕ	τ (ns)	Eff (%)	$\lambda_{láser}$ (nm)
<i>i</i>	138	498.0	5.6	508.0	385	0.90	7.02	55	537
<i>ii</i>	207	499.5	6.4	513.0	527	0.74	6.45	60	540
<i>iii</i>	219	501.5	6.8	515.0	523	0.67	5.74	39	546
<i>iv</i>	139	495.0	8.1	507.0	475	0.85	5.52	26	541
<i>v</i>	212	505.5	8.4	510.0	370	0.76	5.87	19	547
<i>vi</i>	230	518.0	7.4	535.0	615	0.84	6.09	48	566
<i>vii</i>	213	524.5	7.8	541.0	580	0.72	6.49	42	580
<i>viii</i>	220	526.5	8.0	537.0	370	0.71	6.62	34	571

^[a] Concentración del BODIPY: 2 μ M. Longitud de onda de Absorción (λ_{ab}) y fluorescencia (λ_{fl}), absorción molar (ϵ_{max}) (104 M⁻¹cm⁻¹), desplazamiento de Stokes ($\Delta\nu_{st}$), rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) y tiempo de vida medio (τ); ^[b] concentración del BODIPY 2 mM. Eff(%): eficiencia láser, la relación entre la energía de la salida del láser y la energía de la bomba incidente sobre la superficie de la célula s y $\lambda_{láser}$: Longitud de onda de emisión láser.

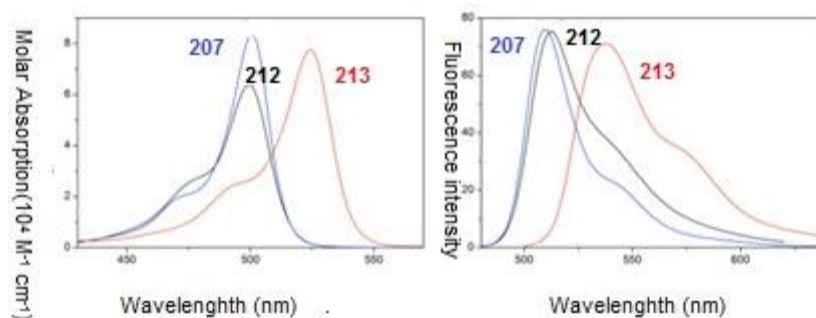


Figura 29. Espectros de absorción y fluorescencia (escalado por la eficiencia de fluorescencia) en etanol de los colorantes que portan un sustituyente *orto*-hidroximetilfenilo en posición meso (**207**, **212** y **213**).

Según los datos recogidos en la Tabla 7, la presencia de un grupo arilo *orto*-funcionalizado en posición meso del núcleo BODIPY (BODIPYs **207**, **219**, **212**, **213** y **220**) apenas modifica las propiedades fotofísicas respecto a los BODIPYs análogos sin sustitución en C-8 (**138**, **139** y **230**). Por otro lado, se observa que en todos los casos se origina un ligero aumento en el coeficiente de absorción (ϵ_{max}) y un ligero desplazamiento batocrómico en sus bandas de emisión absorción (λ_{ab}) en los derivados C-8 sustituidos en comparación con los análogos sin sustituyente en meso (Tabla 7, comparar p. ej. la entrada *i* con las entradas *ii*, *iii*, *iv* con *v*; y *vi* con *vii*, *viii*). Este desplazamiento es más acusado en los compuestos **230**, **213** y **220**, (Tabla 7, entradas *vi*, *vii*, *viii*) debido a que el efecto inductivo dador de electrones de los grupos etilos en las posiciones C-2-C-6 provoca un desplazamiento batocrómico respecto a sus análogos sin sustituyentes en esas posiciones.

Como hemos mencionado con anterioridad, la presencia de un grupo arilo *orto*-funcionalizado en posición meso produce un aumento significativo del rendimiento cuántico fluorescencia respecto a BODIPYs con residuos arilo en C-8 sin sustituyente en *orto* (comparar el valor de ϕ en **140**, con los valores de ϕ en **207**, **212** y **213**, Tabla 7). Este fenómeno, como se ha indicado anteriormente, es debido a que la restricción de giro del grupo arilo propiciada por el sustituyente en *orto* que disminuye los procesos de desactivación no radiante y por lo tanto aumenta las probabilidades de absorción y también de emisión de fluorescencia.

En la Figura 30 se muestran además los ángulos diedros correspondientes a la conformación del residuo 8-arilo más estable, la barrera de rotación (E_{rot} en kcal/mol),

calculados a partir de las correspondientes superficies de energía potencial y los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ) para estos derivados. La orientación del sustituyente arilo en C-8 respecto al núcleo de BODIPY está claramente influenciada por el sustituyente en *orto* (comparar el valor del ángulo entre el residuo C-8 arilo en los derivados **140** y **207**, 50° y 70° , respectivamente, Figura 29), y por la presencia de grupos metilo en C-1 y C-7 que refuerzan el impedimento estérico con dicho sustituyente en el resto 8-arilo (p.ej. **212**, **213**, 90° en ambos casos, Figura 29). La simbiosis entre ambos efectos (sustituyente *orto*, y metilos en C-1 y C-7) evita la libre rotación del grupo arilo y hace que el sustituyente aromático se disponga en una orientación completamente ortogonal respecto al núcleo de BODIPY.²⁶³

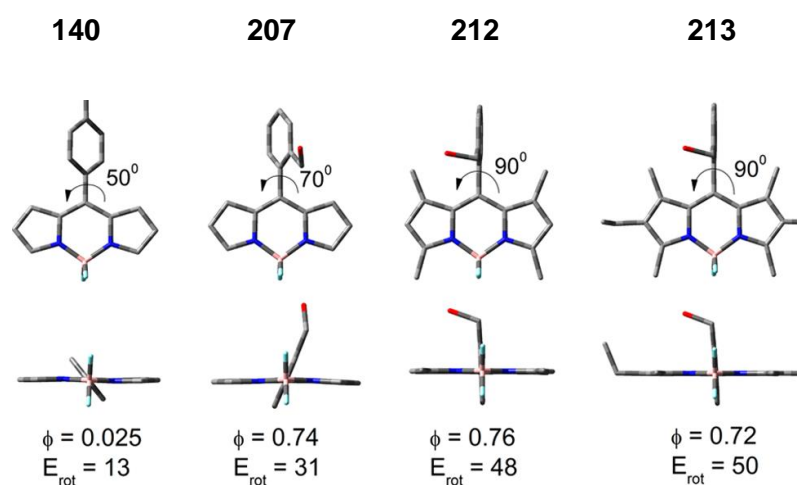


Figura 30. Dos vistas diferentes de la geometría optimizada del estado fundamental para 8-tolil BODIPY **140**²⁶⁴ y para los BODIPYs **207**, **212** y **213** conteniendo grupos *orto*-hidroximetilfenilo en posición C-8 (meso).

Por último, la presencia de un sustituyente en la posición *para* del anillo de arilo, como el átomo de bromo en los BODIPYs **219** y **220** (Tabla 7, entradas *iii* y *viii*), no origina cambios significativos en la posición de sus bandas de absorción y emisión, sin embargo se observa una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia por efecto del átomo pesado.

²⁶³ (a) Li, F.; Yang, S. I.; Ciringh, Y.; Seth, J.; Martin, C. H., III; Singh, D. L.; Kim, D.; Birge, R. R.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10001–10017. (b) Zheng, Q.; Xu, G.; Prasad, P. N. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 5812–5819. (c) Betancourt-Mendiola, L.; Valois-Escamilla, I.; Arbeloa, T.; Bañuelos, J.; López-Arbeloa, I.; Flores-Rizo, J. O.; Hu, R.; Lager, E.; Gómez-Durán, C. F. A.; Belmonte-Vázquez, J. L.; Martínez-González, M. R.; Arroyo, I. J.; Osorio-Martínez, C. A.; Alvarado-Martínez, E.; Urías-Benavides, A.; Gutierrez-Ramos, B. D.; Tang, B. Z.; Peña-Cabrera, E. *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 5771–5782.

²⁶⁴ Duran-Sampedro, G.; Agarrabeitia, A.R.; Garcia-Moreno, I.; Costela, A.; Bañuelos, J.; Arbeloa, T.; López Arbeloa, I.; Chiara, J. L.; Ortiz, M. J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, *32*, 6335–6350.

De este modo, los nuevos derivados 8-C-*o*-hidroximetilfenil-BODIPYs son altamente fluorescentes con elevados rendimientos cuánticos respecto a sus correspondientes análogos 8-C-arilo sin sustituyente en *orto*, p. ej. **140**.

En relación con el comportamiento láser, estos colorantes han sido caracterizados bombeando los mismos transversalmente usando como láser de bombeo el tercer armónico del Nd: YAG a 355 nm. Todos los colorantes se disolvieron en acetato de etilo y se analizó su *eficiencia láser* en función de la concentración, a fin de optimizar la misma. La *eficiencia láser* se define como la relación entre la energía de emisión del colorante con respecto a la de bombeo. En la Tabla 7 se recogen, para cada colorante, la concentración óptima, la eficiencia láser y la longitud de onda de emisión. Como hemos mencionado anteriormente, en la Tabla 7 se comparan los derivados de BODIPY sin sustituir en C-8 (**138**, **139**, **230**) con los correspondientes derivados de BODIPY que incorporan en su estructura un sustituyente arilo *orto*-sustituido en posición meso.

Las propiedades láser de estos colorantes presentan una emisión láser “broad-line-width”, con una energía umbral de bombeo de ~ 0,8 mJ, divergencia de 5 mrad y duración temporal del pulso (FWHM) de 8 ns cuando se utiliza una cavidad resonante plano-paralela y unas eficiencias láser entorno al 20 y el 60%, en la región espectral verde (540-585 nm).

El comportamiento láser de los colorantes muestra una buena correlación con sus propiedades fotofísicas: cuanto más larga es la longitud de onda de fluorescencia, “más en el rojo” se convierte la emisión láser, y mayores rendimientos cuánticos de fluorescencia determinan mayores eficacias láser.

El desplazamiento de Stokes ($\Delta\nu_{St}$) es un factor clave para explicar el excelente comportamiento láser de los derivados de BODIPY. Ya que, un aumento significativo del desplazamiento de Stokes supone una disminución de los procesos de reabsorción y reemisión que reducen la eficiencia de emisión de láser (potencian la acción del láser) lo cual es particularmente importante cuando se requieren disoluciones de colorantes muy concentradas para inducir la emisión del láser.

Por consiguiente, la eficiencia láser de los derivados relacionados con **138** (i.e. **207** y **219**) son similares o ligeramente inferiores a las de sus precursores, a pesar de la disminución del rendimiento cuántico de la fluorescencia que muestran estos derivados que es compensado por sus altos valores de desplazamientos de Stokes. Por el

contrario, los derivados relacionados con **139** (p. ej. **212**) y **230** (p. ej. **213** y **220**) presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia y desplazamientos de Stokes más bajos que sus correspondientes precursores, los cuales presentan las menores eficiencias láser (20-30%).

La fotoestabilidad es también una característica importante que define los colorantes fluorescentes y, por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos de fotodescomposición sobre los compuestos **212** y **213** como representantes de esta familia de derivados de BODIPY. Ambos colorantes presentaron una alta fotoestabilidad bajo drásticas condiciones de bombeo, manteniendo su emisión del láser a nivel de su intensidad inicial después de 60.000 pulsos de bombeo.²⁶⁵

II.4 Conjugación de BODIPYs mediante reacciones click y Staudinger/Aza-Wittig

II.4.1 Antecedentes y estado actual del tema

La bioconjugación, o derivatización covalente de biomoléculas, es un campo de investigación en continuo crecimiento.²⁶⁶ El etiquetaje fluorescente es una de las metodologías más usadas para la detección y análisis de moléculas.²⁶⁷ Una de las aplicaciones más representativas del etiquetaje fluorescente, es el estudio de las interacciones biológicas que permiten la comprensión de algunos procesos biológicos que mediante la genómica no se han podido resolver. En los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos para la derivatización específica de los cuatro tipos de biomoléculas principales: proteínas,²⁶⁸ lípidos,²⁶⁹ ácidos nucleicos,²⁷⁰ y carbohidratos.²⁷¹

²⁶⁵ Se evaluó la fotoestabilidad de los colorantes (**212** y **213**) irradiando bajo condiciones de láser 1 mL de una disolución del BODIPY en EtOH y monitorizando la disminución de la intensidad inducida por láser en función del número de impulsos de bombeo a una velocidad de repetición de 30 Hz. La emisión láser de ambos colorantes permaneció en el nivel inicial después de 60.000 pulsos de bombeo.

²⁶⁶ Hermason, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 2^o ed., Academic Press, San Diego, CA, **2008**.

²⁶⁷ Patton, W. F. *Electrophoresis*, **2000**, 21, 1123-1144.

²⁶⁸ Rezende L. C. D.; Emery, F. S. *Orbital: Electron*, **2013**, 5, 62-83.

²⁶⁹ a) Rasmussen, J-A. M.; Hermetter, A. *Chemical synthesis of fluorescent glycerol- and sphingolipids*, *Progress in Lipid Research*, **2008**, 47, 436-460; b) Marks, D. L.; Bittman, R.; Pagano, R. E. *Histochem. Cell Biol.*, **2008**, 130, 819-832.

²⁷⁰ a) Ehrenschrwender, T.; Wagenknecht, H-A. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 2301-2304; b) Okamura, Y.; Watanabe, Y. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), **2006**, 335, 43-56; c) Tram, K.; Twohig, D.; Yan. H. *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids.*, **2011**, 30, 1-11.

²⁷¹ a) Wong, C. S.; Hoogendoorn, S.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Codée, J. D. C. *Chem. Plus Chem.*, **2015**, 80, 928-937; b) Shie, J.J.; Liu, Y. C.; Lee, Y. M.; Lim, C.; Fang, J. M.;

Estos métodos se basan en el uso de reacciones quimioselectivas y bioortogonales que permiten la conjugación con la molécula en estudio en condiciones fisiológicas y causando la mínima perturbación posible de la forma activa de la misma.

Generalmente la técnica de conjugación implica la introducción de grupos reactivos en las moléculas a conjugar.

i) Conjugación de sondas fluorescentes a carbohidratos: Glicosondas

A pesar de que las primeras estructuras de los carbohidratos fueron descritas por Fischer entre 1884 y 1894, ha sido necesario casi un siglo para que la comunidad científica apreciara el papel que estas moléculas desempeñan a nivel biológico ya que introducen una gran complejidad y heterogeneidad indispensables para la vida.²⁷² La variabilidad estructural de los glicanos (diversidad en las posiciones de anclaje: 1→2, 1→3, 1→4 o 1→6, configuraciones anoméricas: α o β , tamaño de anillo: furanosa o piranosa, y las distintas ramificaciones y funcionalizaciones de sus hidroxilos (esterificación, sulfatación, fosforilación, etc) permite la codificación de mucha más información que en el caso de las proteínas y ácidos nucleicos. Es por ello que se ha denominado glicocódigo²⁷³ a toda la información que los carbohidratos son capaces de expresar, tal y como una secuencia de ADN codifica información para una función determinada.

La cubierta hidrófila de carbohidratos que recubre la superficie de las células, conocida como glicocálix, sirve como punto de anclaje para otras células, virus, bacterias, toxinas, hormonas y otras moléculas (Figura 31), y forma la primera línea de

Wong, C. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 9953-9961; c) Papalia, T.; Siracusano, G.; Colao, I.; Barattucci, A.; Aversa, M. C.; Serroni, S.; Zappalà, G.; Campagna, S.; Sciortino, M. T.; Puntoriero, F.; Bonaccorsi, P. *Dyes Pigments*, **2014**, 110, 67-71; d) Yu, Y., Bogliotti, N., Tang, J. Xie, J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 2013, 7749-7760; e) Uppal T.; Bhupathiraju N. V. S. D. K.; Vicente M. G. H. *Tetrahedron*, **2013**, 69, 4687-4693; f) Groves, P.; Strzelecka-Kiliszek, A.; Sekrecka-Belniak, A.; Canales, A.; Jiménez-Barbero, J.; Bendorowicz-Pikula, J.; Pikula, S.; Cañada, F. J. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 5332-5338; g) Sarver, S. A.; Keithley, R. B.; Essakaa, D. C.; Tanaka, H.; Yoshimura, Y.; Palcic, M. M.; Hindsgaul, O.; Dovichi, N. J. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1229, 268-273; h) Essaka, D. C.; Prendergast, J.; Keithley, R. B.; Palcic, M. M.; Hindsgaul, O.; Schnaar, R. L.; Dovichi, N. J. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 2799-2804; i) Bonaccorsi, P.; Aversa, M. C.; Barattucci, A.; Papalia, T.; Puntoriero, F.; Campagna, S. *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 10550-10552.

²⁷² a) Varki, A. *Glycobiology*, **1993**, 3, 97-130; b) Varki, A. *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, **1999**, p. 625-634; c) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.

²⁷³ a) Ambrosi, M.; Cameron N. R.; Davis, B. G. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 1593-1608; b) Gabius H.J. and Editor, *The Sugar Code: Fundamentals Of Glycosciences*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2009**, 569.

interacción con el medio extracelular. Estas moléculas son responsables de las funciones de reconocimiento y adherencia, de gran relevancia en múltiples procesos biológicos esenciales, tanto para la función fisiológica normal de los organismos (reconocimiento célula-célula, la regulación del crecimiento y diferenciación celular, la fertilización, la respuesta inmune, la respuesta inflamatoria) como en el desarrollo de numerosas patologías (infecciones microbianas, metástasis del cáncer, etc).²⁷⁴

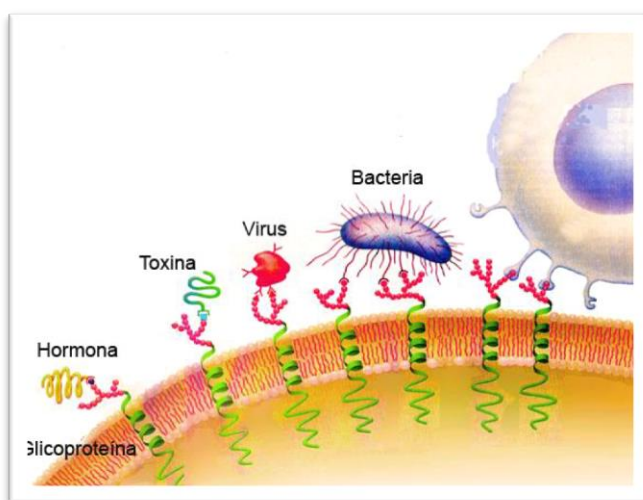


Figura 31. Interacción de los carbohidratos de la superficie celular con diferentes dianas biológicas

Esta capacidad de interactuar selectivamente con diferentes receptores de superficie de la célula, ha propiciado también la utilización de los carbohidratos con otros fines. Así en la actualidad existe un creciente interés por disponer de glicosondas fluorescentes en las que al componente carbohidrato se ha incorporado una sonda fluorescente.²⁷⁵ Esta asociación mejora considerablemente la internalización de la sonda en las células, favorece su solubilidad en medios acuosos, incrementa su biocompatibilidad y además la hace selectiva para un determinado tejido.²⁷⁶ En la Figura 32 se muestran algunas de las glicosondas preparadas por combinación de diferentes monosacáridos (*N*-acetilgalactosamina, galactosa o manosa) con distintos cromóforos (rodamina (RB), dicianometileno (DCM) ó cumarina). Todos ellos fueron sintetizados

²⁷⁴ a) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science*, **2001**, 291, 2357-2364. b) Haltiwanger, R. S.; Lowe, J. B. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 491-537. c) Hart, G. W.; Copeland, R. J. *Cell*, **2010**, 143, 672-676. d) Hudak, J. E.; Bertozzi, C. R. *Chem. Biol.*, **2014**, 21, 16-37. e) Dalziel, M.; Crispin, M.; Scanlan, C. N.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A. *Science*, **2014**, 343, 37-45.

²⁷⁵ He, X-P.; Zhang, Y.; James, T. D.; Li, Y.; Chen, G. R.; Xie, J. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 82-90.

²⁷⁶ He, X-P.; Zeng, Y. L.; Zang, Y.; Li, J.; Field, R. A.; Chen, G. R. *Carbohydr. Res.*, **2016**, 429, 1-22.

para el reconocimiento selectivo de lectinas²⁷⁷ o de receptores de carbohidratos de la superficie celular.²⁷⁸ Por ejemplo, la glicosonda **231**, gracias a su residuo de *N*-acetilgalactosamina, presenta una elevada afinidad por la lectina de tipo C, ASGPr, presente en las células hepáticas dándose además la característica de encontrarse sobreexpresada cuando existe daño hepático. Para aprovechar esta afinidad por la lectina, el derivado **231** fue autoensamblado, presumiblemente vía interacciones π - π con óxido de grafeno para generar un nuevo material compuesto, el cual ha perdido completamente la fluorescencia por un proceso de transferencia de energía de tipo FRET (“Förster resonance energy transfer”).²⁷⁹ Una vez que este material es expuesto a la lectina ASGPr, la glicosonda es reconocida y se disocia del óxido de grafeno (GO) recuperándose la fluorescencia, constituyendo una sencilla herramienta para la detección y diagnóstico de células tumorales de hígado.²⁸⁰

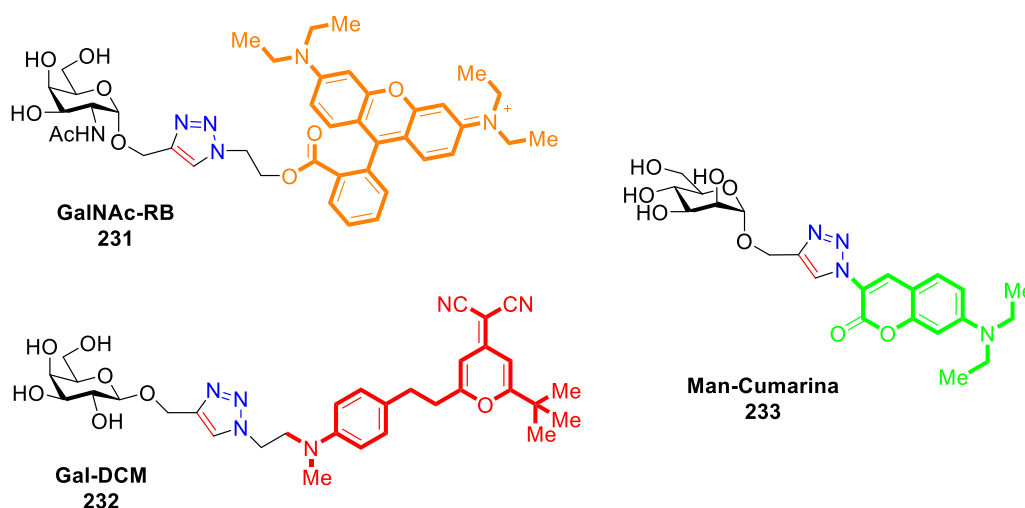


Figura 32. Glicosondas

Alternativamente, y pretendiendo emular que en las células coexisten múltiples receptores de diferentes carbohidratos, las glicosondas Gal-DCM **232** y Man-Cumarina **233** fueron co-ensambladas sobre la superficie del grafeno. Análogamente, se observó la formación de un nuevo material que exhibía total desaparición de la fluorescencia. Sin embargo, en presencia de cada de una de las lectinas específicas para el carbohidrato

²⁷⁷ a) He, X.-P.; Li, R.-H.; Maisonneuve, S.; Ruan, Y.; Chen G.-R.; Xie, J. *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 14141-14144; b) Ji, D.-K.; Chen, G.-R.; He X.-P.; Tian, H. *Adv. Funct. Mater.*, **2015**, 25, 3483-3487.

²⁷⁸ Xie, D.; Ji, D.-K.; Zhang, Y.; Cao, J.; Zheng, H.; Liu, L.; Zang, Y.; Li, J.; Chen, G. -R.; James, T. D.; He, X.-P. *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 9418-9421.

²⁷⁹ a) Förster, T. *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7-17; b) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2^a Ed., Kluwer Academic, New York; **1999**.

²⁸⁰ Zhang, H.-L.; Wei, X.-L.; Zang, Y.; Cao, J. Y.; Liu, S.; He, X. P.; Chen, Q.; Long, Y. T.; Li, J.; Chen, G. R. *Adv. Mater.*, **2013**, 25, 4097-4101.

correspondiente [galactosa (gal) o manosa (man)] se recuperaba exclusivamente la fluorescencia de su sonda asociada (DCM o cumarina, respectivamente). La emisión dual de las dos sondas se presenta simultáneamente cuando se produce el reconocimiento por las dos lectinas, proporcionando una herramienta para la detección de múltiples biomarcadores.²⁸¹

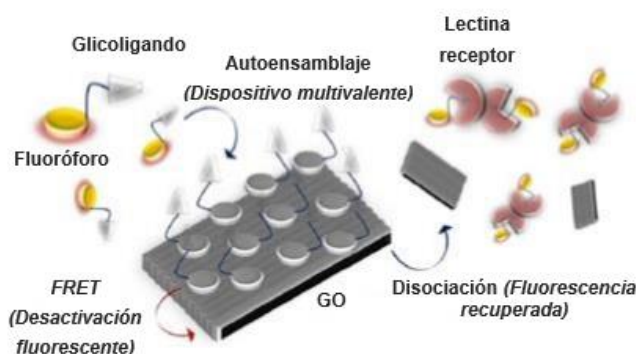


Figura 33. Autoensamblaje supramolecular entre glicosondas y óxido de grafeno (GO) como sustrato para la detención fluorogénica de receptores de lectina.²⁸²

La incorporación de cromóforos de tipo BODIPY no ha sido ajena a esta corriente de utilización de glicosondas en la investigación de algunos problemas biológicos. En uno de los primeros ejemplos, el grupo de Tatami demostró que la conjugación de un BODIPY a un residuo de *N*-acetilglucosamina genera una glicosonda que no sólo mantiene su actividad como inhibidor de la amilasa citoplásmica PNGasa sino que además y debido a la presencia del fluoróforo hidrófobo, se internaliza muy fácilmente en las células haciendo posible su uso como inhibidor en vivo.²⁸³

En una aportación más reciente, Wong y colaboradores diseñaron un derivado azido-BODIPY que es capaz de experimentar reacciones de cicloadición 1,3-dipolares con carbohidrato-alquinos que habían sido cultivados con las células con excelente

²⁸¹ a) He, X-P.; Tian, H. *Small*, **2016**, 12, 144–160; b) Ji, D-K.; Chen, G-R.; He, X-P.; Tian, H.; *Adv. Funct. Mater.*, **2015**, 25, 3483–3487. c) Ji, D-K.; Zhang, Y.; He, X-P.; Chen, G-R. *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3, 6656–6661.

²⁸² He X. P., Zeng Y. L., Zang Y., Li J., Field R. A., Chen G. R. *Carbohydr. Res.*, **2016**, 429, 1-22.

²⁸³ Hagihara, S.; Miyazaki, A.; Matsuo, I.; Tatami, A.; Suzuki, T.; Ito, Y. *Glycobiology*, **2007**, 17, 1070–1076.

selectividad. Esta estrategia hace posible la visualización de los glicoconjugados específicos o la detección de biomarcadores (Figura 34).²⁸⁴

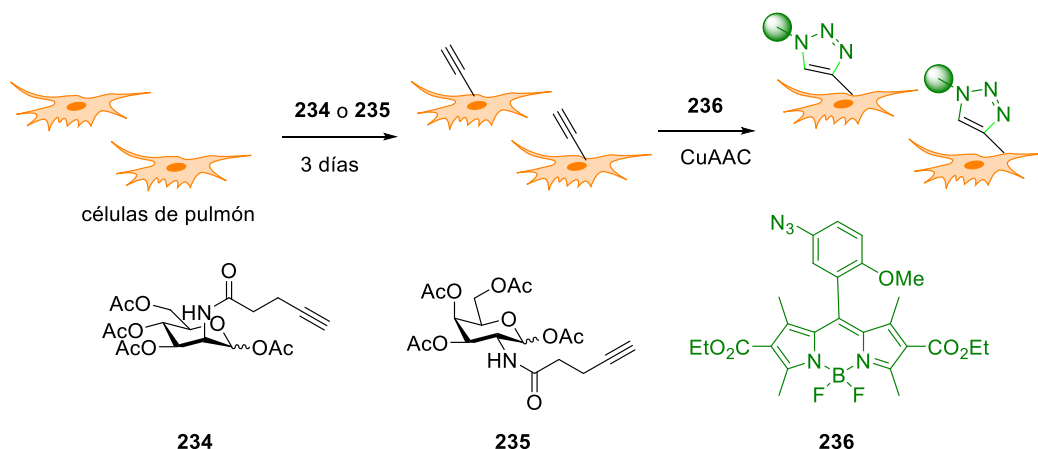


Figura 34. Ilustración de la estrategia de Wong para el marcado fluorescente de células.

ii) Conjugación de sondas fluorescentes a proteínas, péptidos y aminas

La capacidad del ser humano para revelar los detalles de la biología celular ha aumentado considerablemente gracias al descubrimiento y avance de diversas técnicas de visualización. Entre ellas destaca el uso de la fluorescencia en proteínas.

Las cadenas de aminoácidos, que constituyen las proteínas son capaces de plegarse en una estructura tridimensional o estado nativo, fundamental para poder ejercer su función biológica. Algunos de estos aminoácidos son en sí mismos fluoróforos, como es el caso del triptófano, tirosina y fenilalanina.²⁸⁵ La fluorescencia de las proteínas está generalmente dominada por la del triptófano, que absorbe luz cerca de 280 nm y que emite luz cerca de los 340 nm, en la región del ultravioleta. También hay algunas proteínas naturales que contienen otros fluoróforos que no son aminoácidos. La más conocida es la “green fluorescent protein” o GFP procedente de la medusa *Aequorea victoria* y que ha sido ampliamente utilizada para unirla a otras proteínas y así conferirles fluorescencia en el rango del color verde.²⁸⁶ De esta manera se ha podido estudiar su localización e interacciones a nivel celular.

Otra alternativa es la de modificar químicamente la proteína de interés con un fluoróforo sintético, lo que permite elegir el “sitio” de la proteína donde ubicarlo y la

²⁸⁴ Shie, J.-J.; Liu, Y.-C.; Lee, Y.-M.; Lim, C.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 9953–9961.

²⁸⁵ Chen, Y.; Barkley, M. D. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 9976–9982.

²⁸⁶ Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G. *Science*, **1994**, *263*, 802–805.

longitud de onda para detectarlo.²⁸⁷ Eso es fundamental cuando se trata de microscopía de fluorescencia, sistemas no preparados para trabajar en la región del ultravioleta, que es la región dónde se ha de trabajar con el triptófano. Como contrapartida, es necesario comprobar que dicho fluoróforo no modifica sustancialmente la estructura y función de la proteína de interés.

La introducción de los fluoróforos en las proteínas se realiza mediante una reacción química que emplea funcionalidades expuestas en la superficie de las proteínas, normalmente residuos de lisina o cisteínas, que reaccionarán por sus funcionalidades amino o tiol, respectivamente.²⁸⁸ Mientras que, las sondas que reaccionan con grupos tioles son más específicas y encuentran aplicación en la determinación inequívoca de la estructura de una proteína, el uso de las sondas reactivas de grupos amino tiene mucho mayor aplicación ya que se han empleado para modificar proteínas, péptidos, ligandos, oligonucleótidos y otras biomoléculas. Estos conjugados vía aminos han sido empleados en inmunoquímica, trazado de células, marcaje de receptores y citometría de fluorescencia. En todas estas aplicaciones, la estabilidad del enlace covalente entre el cromóforo y la biomolécula es crítico.

Probablemente, la funcionalidad reactiva de grupos amino más ampliamente utilizada en el marcaje de proteínas lo constituyen los grupos isocianato e isotiocianato, lo que conlleva la formación de las correspondientes ureas y tioureas, respectivamente. Los isocianatos, al ser muy reactivos, pueden presentar problemas en su almacenamiento, pero originan ureas de una gran estabilidad en medios biológicos. Como alternativa a los isocianatos, encontramos los isotiocianatos, de una reactividad más moderada pero muy estables en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Estas características han favorecido que el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) sean de los reactivos más empleados para preparar bioconjugados fluorescentes. La fluoresceína emite una fluorescencia amarillo verdosa, tras ser excitada por una luz azul con una absorción máxima a 450 nm y una emisión máxima a 525 nm. La rodamina emite una fluorescencia roja anaranjada, tras ser excitada por una luz verde con una absorción máxima entre 540 y 560 nm y una emisión máxima a 370 nm.

²⁸⁷ a) Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. *Science*, **1998**, 281, 269–272. b) Taylor, D. L.; Wang, Y. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1978**, 75, 857–861. c) Marks, K. M.; Nolan, G. P., *Nat. Methods*, **2006**, 3, 591–596.

²⁸⁸ The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, J. Johnson and M. Spence (eds.) 11^o Edition, Life Technologies, **2010**.

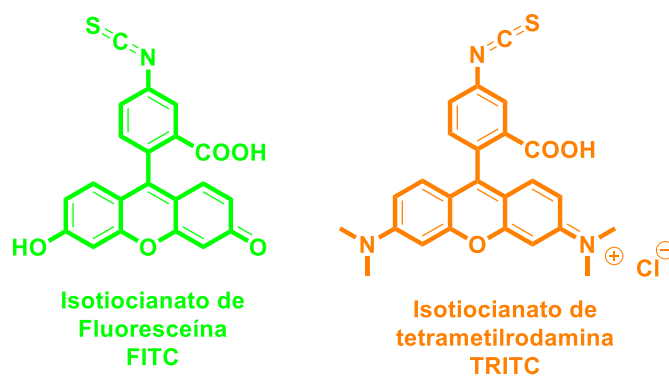


Figura 35. Isotiocianatos de fluoresceína y tetrametilrodamina.

II.4.2 Objetivos específicos

El reciente interés de nuestro grupo de investigación en la síntesis y utilización de sondas fluorescentes de tipo BODIPY con un centro reactivo, para su unión a diferentes moléculas nos llevó a plantearnos como objetivo el desarrollo de metodologías que permitieran la conjugación y que pudieran conducir a moléculas interesantes con aplicaciones en Química médica o Biología.

En este contexto, se plantea como primer objetivo la conjugación de BODIPYs a carbohidratos sencillos, moléculas en las que nuestro grupo de investigación tiene una gran experiencia y que, tal y como se ha pretendido poner de manifiesto en la introducción, son de un enorme interés desde un punto de vista biológico. Como primera aproximación y dada la robustez de la cicloadición entre alquinos y azidas catalizada por cobre, decidimos ensayar este tipo de acoplamiento sobre derivados de BODIPY 8-azidometilfenilsustituídos, accesibles a partir de los correspondientes 8-hidroximetilfenil-BODIPYs que han sido preparados en el capítulo anterior. Este objetivo ha sido llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Eduardo Peña-Cabrera, y parte de los resultados, que fueron obtenidos conjuntamente, están recogidos en la tesis doctoral de la Dra. Mayra Rosario Martínez González (Universidad de Guanajuato, Diciembre 2015).

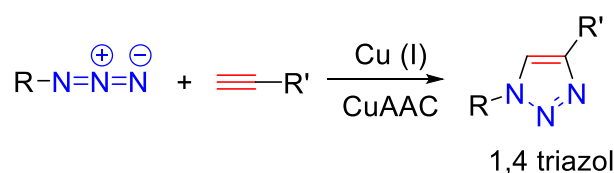
II.4.3 Conjugación de BODIPYs a carbohidratos sencillos

II.4.3.1 Reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por cobre (CuAAC)

La preparación de las glicosondas comentadas hasta este momento han empleado una reacción 1,3-dipolar entre alquinos y azidas. Este método se ha consolidado como reacción prototipo dentro de la química click, especialmente desde el

descubrimiento de su catálisis por Cu(I).²⁸⁹ El concepto de “click-chemistry” fue introducido por K. B. Sharpless el año 2001 como una aproximación de síntesis modular que utiliza solamente aquellas transformaciones químicas que son más prácticas, de máxima fiabilidad y que transcurren con altos rendimientos.²⁹⁰

La cicloadición alquino azida catalizada por cobre (CuAAC) constituye una versión mejorada de la cicloadición térmica de Huisgen,²⁹¹ ya que la incorporación de la catálisis del Cu(I) no solo reduce sustancialmente el tiempo de reacción, sino que además facilita que transcurra con total regioselectividad dando lugar a la formación exclusiva del regioisómero del triazol 1,4-disustituído. (Esquema 69).²⁹²



Esquema 69. Cicloadición [3+2] (CuAAC) de azidas y alquinos.

Algunas de las virtudes que presenta esta reacción incluyen: a) las funciones azido y alquino son fáciles de introducir en un sustrato, no reaccionan entre ellas y muestran una extraordinaria tolerancia a la presencia de otros grupos; b) la ligación de tales funciones requiere solamente cantidades estequiométricas de los productos de partida, c) la reacción no genera subproductos y tiene lugar con altos rendimientos; d) las reacciones pueden llevarse a cabo en disoluciones acuosas en presencia de oxígeno o en disolvente orgánicos cuando los productos no son solubles en mezclas acuosas, pueden transcurrir a temperatura ambiente o a reflujo o ser asistidas por irradiación con microondas.

²⁸⁹ a) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 51–68; b) Wu, P.; Fokin, V. V. *Aldrichimica Acta*, **2007**, 40, 7–17; c) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 1249–1262; d) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 2952–3015; e) Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2013**, 9, 2715–2750; f) Schulze, B.; Schubert, U. S. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 2522–2571; g) Hassan, S.; Müller, T. J. J. *Adv. Synth. Catal.*, **2015**, 357, 617–666; h) Haldón, E.; Nicasio, M. C.; Pérez, P. J. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 9528–9550.

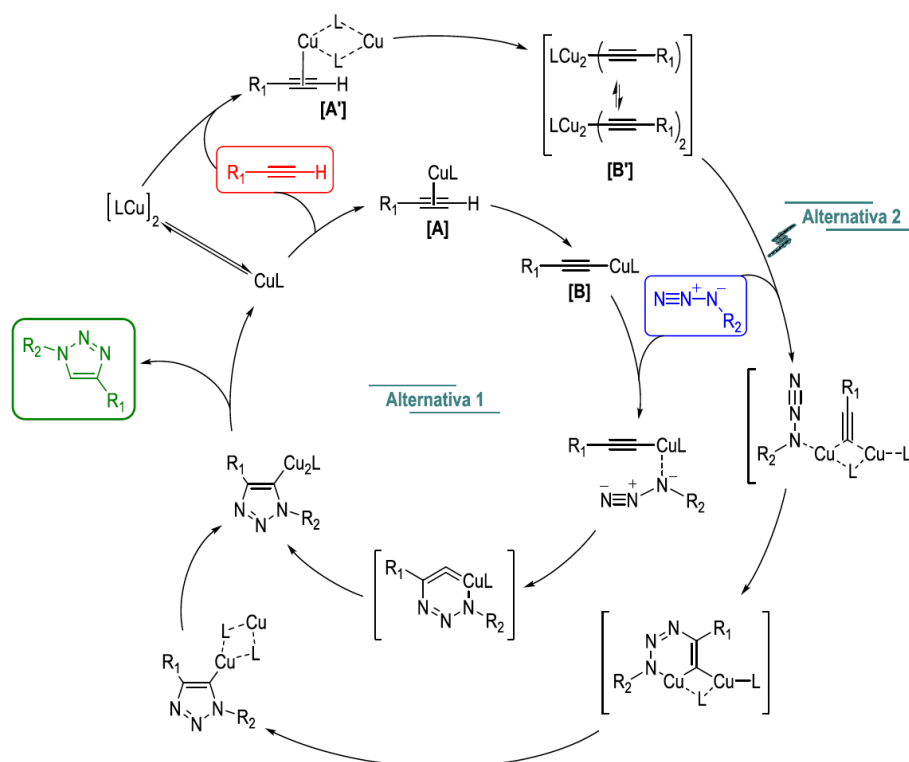
²⁹⁰ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596–2599.

²⁹¹ Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L. *Chem. Ber.*, **1967**, 100, 2494–2507.

²⁹² Zhu, L.; Brassard, C. J.; Zhang, X.; Guha, P. M.; Clark, R. J. *Chem. Rec.*, **2016**, 16, 1501–1517.

Si bien la reacción de cicloadición térmica de Huisgen ocurre mediante un mecanismo concertado, para la versión catalizada por Cu(I) se ha postulado un mecanismo por etapas en base a estudios teóricos y cinéticos. En el Esquema 70 se presentan las propuestas mecanísticas de Sharpless²⁹³ (alternativa 1) y Maarseveen²⁹⁴ (alternativa 2).

En ambos mecanismos se propone que el ciclo catalítico comienza con la formación de especies de Cu(I)-acetileno [A] y [A*] a través del complejo π . Cálculos teóricos indican que la coordinación del cobre disminuye el pKa del enlace C-H del alquino, por lo que la desprotonación en sistemas acuosos se hace posible incluso sin adición de la base. La complejación alquino- π es endotérmica, pero la formación de las especies [B] y [B*] es exotérmica, lo cual apoya que el tipo de reacciones aumente su velocidad en presencia del metal.



Esquema 70. Mecanismos propuestos por Sharpless (alternativa 1) y Maarseveen (alternativa 2) para el ciclo.

²⁹³ Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V.V. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 210-216.

²⁹⁴ Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 51–68.

Indiscutiblemente, la reacción CuAAC se ha convertido, en uno de los métodos más robustos para llevar a cabo la unión irreversible de dos entidades moleculares de distinta naturaleza de una forma rápida y fiable. La eficiencia y fiabilidad de esta reacción ha determinado que en los últimos años se hayan desarrollado múltiples aplicaciones en campos tan variados como el descubrimiento de fármacos, la bioconjugación, la ciencia de materiales, y otras áreas relacionadas. Además, las similitudes isostéricas entre los grupos amida y los anillos de 1,2,3-triazol (Figura 36) son responsables en gran medida del interés de los triazoles dentro de las aplicaciones biológicas.²⁹⁵ Las propiedades fisicoquímicas de esta unidad estructural hacen de ella un excelente mimético del enlace peptídico. Estos heterociclos aromáticos poseen una localización atómica y unas propiedades electrónicas similares a las de la función amida, con la ventaja de la resistencia a la hidrólisis y a los procesos de oxidación o reducción.

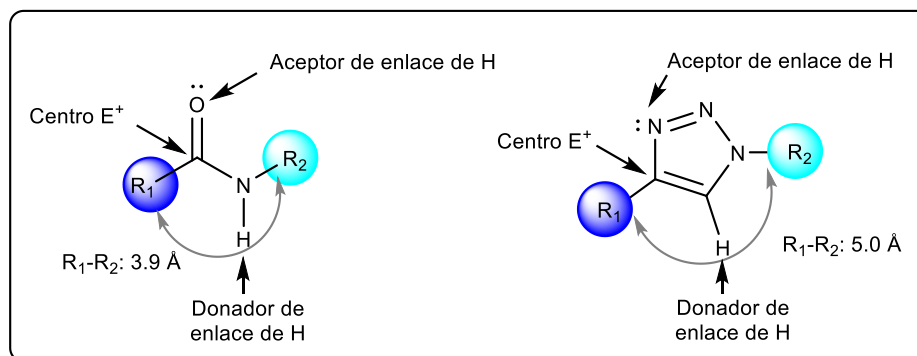


Figura 36. Similitudes topológicas y electrónicas de amidas y 1,2,3-triazoles.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, no es de extrañar que decidiéramos ensayar en primer lugar la conjugación de los BODIPYs objeto de este trabajo con monosacáridos mediante una reacción del tipo CuAAC.

A continuación se describirán la obtención de los componentes portadores de las funciones alquino y azida, la reacción de conjugación vía cicloadición 1,3-dipolar (CuAAC) así como la caracterización fotofísica de algunos de los derivados sintetizados.

²⁹⁵ Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15366–15367.

II.4.3.2 Síntesis de los pares BODIPY-alquino/carbohidrato-azida y BODIPY-azida/carbohidrato-alquino y estudio de su reacción CuAAC.

Esta sección de la presente Tesis Doctoral ha sido desarrollada en colaboración con el grupo del Prof. Eduardo Peña-Cabrera de la Universidad de Guanajuato (Méjico) y algunos de los resultados presentados se encuentran también recogidos en la Tesis doctoral de Mayra Rosario Martínez (Diciembre 2015, Universidad de Guanajuato).

Dado que la aproximación sintética para la obtención de las glicosondas que deseábamos desarrollar era mediante una reacción de CuAAC, la primera cuestión era llevar a cabo la síntesis tanto de los derivados de carbohidrato como de los BODIPY con la funcionalidad adecuada.

En relación con el primer “par”, *BODIPY-alquino/carbohidrato-azida*, se escogieron como derivados carbohidrato-azida los compuestos **237-239** que incorporaban la función azida en la posición anomérica. Como carbohidratos de partida se eligieron los monosacáridos más representativos: glucosa, galactosa y manosa.

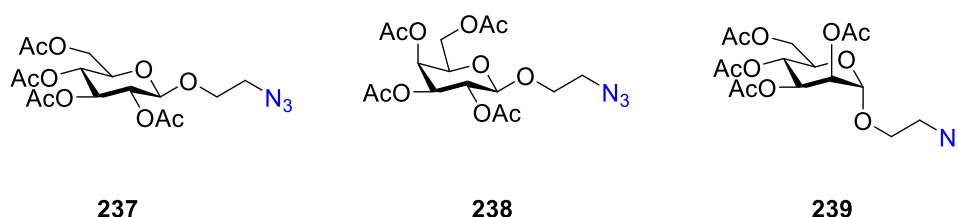
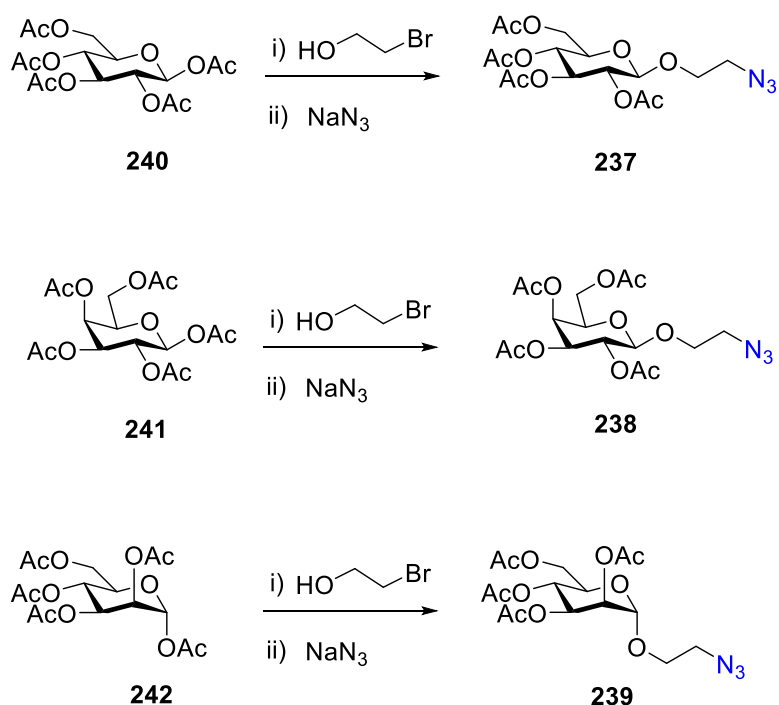


Figura 37. Componentes azido-carbohidrato para la reacción CuAAC

Así, los glicósidos **237-239**, derivados de D-glucosa, D-galactosa y D-manosa, respectivamente (Figura 37), fueron sintetizados por métodos perfectamente establecidos en la literatura mediante una reacción de glicosidación del correspondiente monosacárido pentaacetilado con 2-bromoetanol empleando como promotor $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (Esquema 71).²⁹⁶ En concordancia con la presencia de un grupo participante en la función hidroxilo sobre C-2, se pudo obtener en todos y cada uno de los casos un único anómero correspondiente a una estereoselectividad 1,2-trans. Los glicósidos de 2-bromoetilo resultantes fueron entonces sometidos a una reacción de sustitución nucleófila con azida sódica en dimetilformamida (Esquema 71).²⁹⁷

²⁹⁶ Dahmen, J.; Frejd, T.; Gronberg, G.; Lave, T.; Magnusson, G.; Noori, G. *Carbohydr. Res.*, **1983**, *116*, 303–307.

²⁹⁷ Hasegawa, T.; Fujisawa, T.; Numata, M.; Matsumoto, T.; Umeda, M.; Karinaga, R.; Mizu, M.;



Esquema 71. Síntesis de carbohidratos con grupos azida para CuAAC.

Como segundo componente de este par, se empleó el BODIPY portador de una función alquino **243**, cuya síntesis se realizó en los laboratorios del Prof. Peña-Cabrera a partir del BODIPY de Biellmann **144**, por tratamiento con propargilamina (Figura 38).²⁹⁸

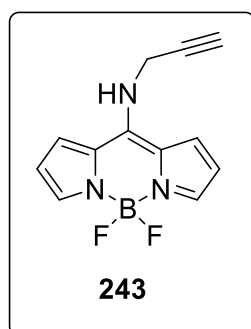


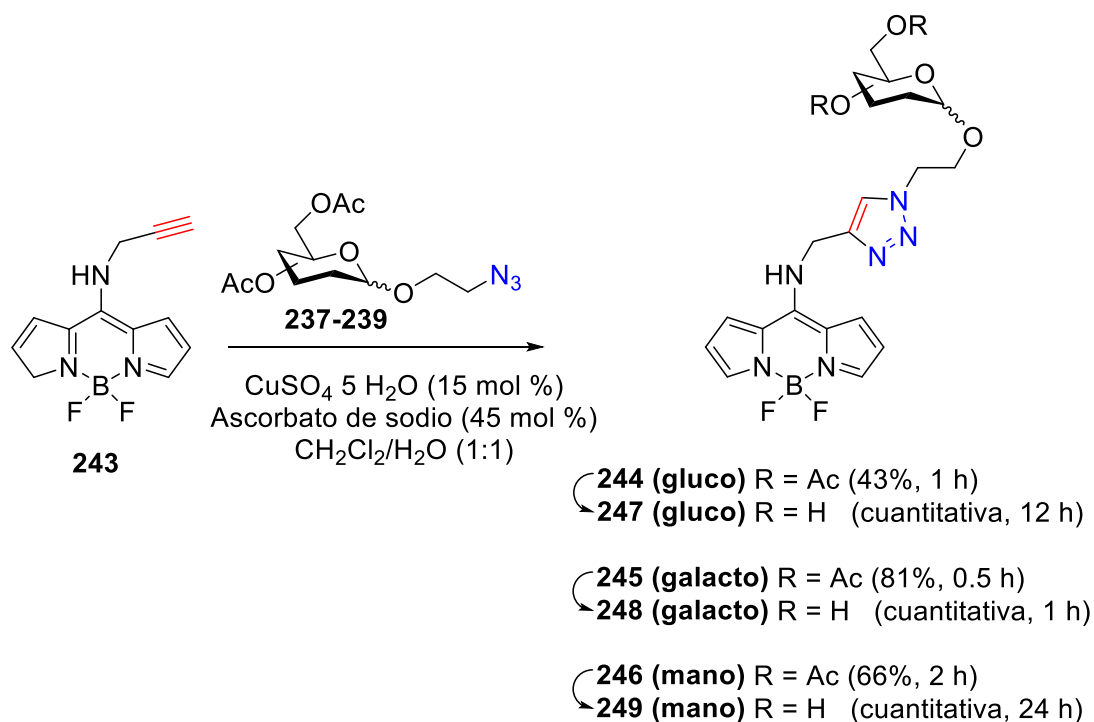
Figura 38. 8-Propargilamino BODIPY **243**

A continuación, y con los dos componentes del primer par en mano, se llevó a cabo la reacción de cicloadición de los azido monosacáridos **240-242** con el alquino **243**. Las condiciones de reacción empleadas fueron: CuSO_4 (15%) como fuente de Cu(I)

Koumoto, K.; Kimura, T.; Okumura, S.; Sakurai, K.; Shinkai, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 3091–3098.

²⁹⁸ Gómez-Durán, C. F. A.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Martín, V.; Sastre, R.; Bañuelos, J.; López Arbeloa, F.; López Arbeloa, I.; Peña-Cabrera, E. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5103-5105.

y ascorbato de sodio (45%) como agente reductor en un sistema bifásico de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (Esquema 72). La reacción transcurrió a temperatura ambiente y permitió el aislamiento de los híbridos carbohidrato-BODIPY **244**, **245**, **246** con rendimientos de moderados a buenos (Tabla 8). Finalmente estos derivados fueron sometidos a una reacción de saponificación por calefacción en $\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}$ para originar las correspondientes glicosondas desprotegidas **247**, **248**, **249** que resultaron ser solubles en agua.



Esquema 72. Reacción de acoplamiento BODIPY-alquino/carbohidrato-azida.

Para abordar la combinación *BODIPY-azida/carbohidrato-alquino*, se llevó a cabo la síntesis del α -D-manopiranosido de propargilo acetilado **251** mediante una reacción de glicosidación del pentaacetato de α -D-manopiranososa con alcohol propargílico. La síntesis del azido-BODIPY **250** se realizó mediante el acoplamiento cruzado de Liebeskind-Srogl entre el ácido *o*-azidobenzilborónico y el BODIPY de Biellman **144**, catalizada por $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{trifurilfosfina}$ y 2-tienilcarboxilato de cobre(I) (CuTC) de acuerdo a la metodología puesta a punto por el Prof. Peña-Cabrera y colaboradores (Figura 39).

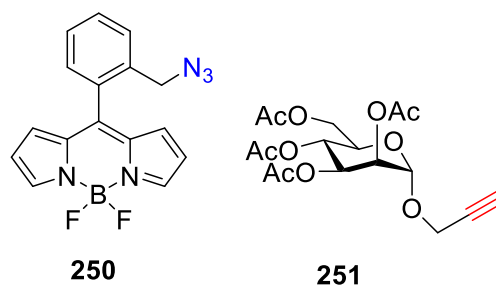
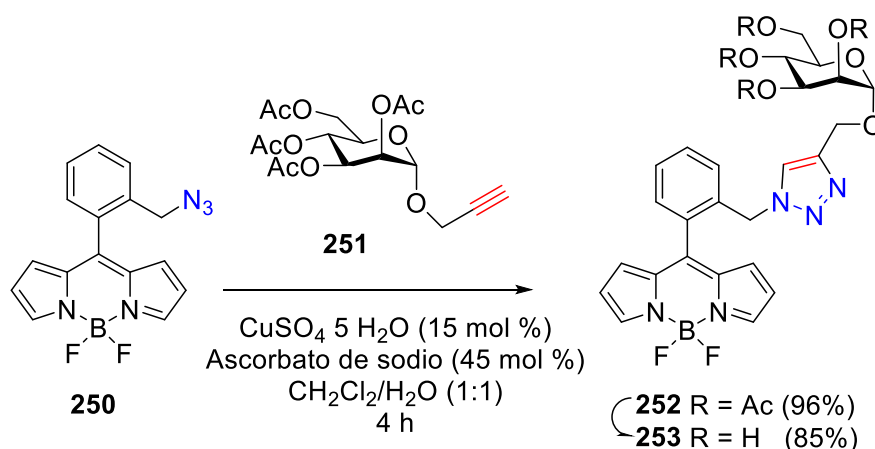


Figura 39. BODIPY-azida/carbohidrato-alkino para reacción de CuAAC.

La correspondiente reacción de CuAAC se llevó a cabo en las mismas condiciones que han sido comentadas con el par anterior, empleando un 15% de CuSO_4 como fuente de Cu(I), un 45% de ascorbato de sodio como agente reductor, en un sistema bifásico de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. La reacción transcurrió a temperatura ambiente durante 4 horas y permitió el aislamiento del nuevo híbrido carbohidrato-BODIPY **252** con un excelente rendimiento (96%) (Esquema 73). Posteriormente, **252** fue tratado con $\text{MeOH}:\text{NEt}_3$ para obtener el correspondiente triazol, **253**. Este último presentó buena solubilidad en agua y fluorescencia verde en éste disolvente. Sin embargo, a diferencia de los híbridos preparados anteriormente no resultó demasiado estable en disolución.



Esquema 73. Síntesis de la glicosonda **252** mediante la combinación BODIPY-azida/carbohidrato-alkino.

II.4.3.3 Propiedades fotofísicas y láser de los híbridos BODIPY-monosacárido

Los correspondientes estudios fotofísicos y láser de los híbridos obtenidos fueron realizados en la Universidad del País Vasco de Bilbao y el Instituto de Química Física Rocasolano del CSIC en Madrid, respectivamente.

i) Propiedades fotofísicas

Se pudo comprobar que las bandas espectrales de los conjugados BODIPY-carbohidrato preparados abarcaban una amplia región del espectro visible (del amarillo al azul) con una marcada influencia del espaciador empleado (Figura 39).

La Tabla 8 muestra los datos obtenidos para las muestras carbohidrato-BODIPY. Como datos relevantes, se observó que los derivados acetilados (**244-246**) o libres (**247-249**) de los derivados glicosil-BODIPY, presentaban casi idénticas propiedades en su cromóforo. Por otro lado, la presencia de la amina secundaria en la posición C-8 del BODIPY tiene un efecto significativo sobre las propiedades fotofísicas de los híbridos carbohidrato-BODIPY resultantes (Tabla 8). Por lo tanto, para su estudio se separaron los compuestos con el fenil triazol sustituido (**252**) de aquellos en los que el heteroátomo reemplazó al fenilo (**244-249**).

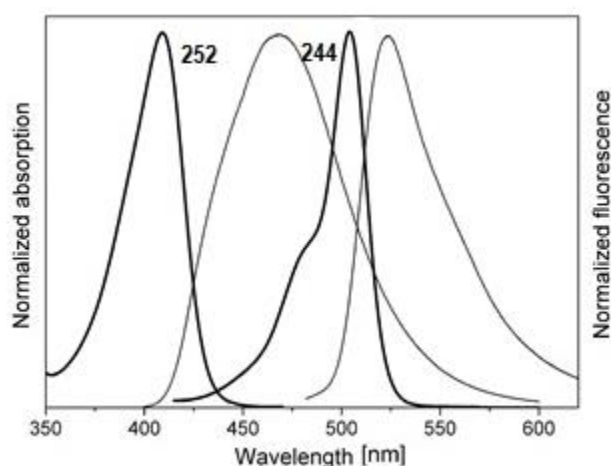


Figura 40. Absorción normalizada (negrita) y espectro de fluorescencia de los compuestos **252** (fenilo como espaciador) y **244** (amina como espaciador) en un disolvente común (dioxano).

- ❖ BODIPYs con un grupo fenilo como espaciador procedentes del par *BODIPY-azida/carbohidrato-alquino*.

En el compuesto **252** (Esquema 73) el triazol está unido al grupo fenilo a través de su posición *orto*. Su reordenamiento geométrico provoca un impedimento estérico con los hidrógenos de las posiciones C1 y C7 del núcleo del BODIPY. Como resultado, el rendimiento cuántico de fluorescencia del compuesto **252** alcanza valores cercanos a 0.9, típicos para los BODIPYs sin sustituyente en C-8. Es de notar el papel clave de la rigidez del cromóforo en las características fotofísicas. Probablemente una unión en otra posición del fenilo (*meta* o *para*) podría inducir una drástica disminución de la eficiencia

de fluorescencia, ya que de ésta manera el anillo tendría libertad de giro.²⁹⁹ Por lo tanto, el compuesto **252** podría ser un marcador fluorescente apropiado para pruebas biológicas; es soluble en agua y el espaciador es adecuado porque no tiene un efecto notable sobre las propiedades del colorante original y retiene la eficiencia de fluorescencia de los BODIPY sin sustitución en C-8.

Tabla 8. Datos fotofísicos de los híbridos BODIPY-carbohidrato en 1,4-dioxano y agua

Dioxano	252	244	245	246	247	248	249
λ_{ab} (nm)	504.0	409.0	409.0	409.0	409.0	408.5	409.0
$\epsilon \times 10^{-4}$ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	4.5	2.9	3.2	3.2	2.1	2.1	2.5
λ_{fl} (nm)	517.0	468.5	467.5	468.0	468.5	467.0	468.0
ϕ	0.83	0.81	0.96	0.94	0.79	0.89	0.90
T (ns)	7.09	4.71	4.66	4.67	4.51	4.53	4.57
Agua	252	244	245	246	247	248	249
λ_{ab} (nm)	503.5	400.5	400.5	400.0	398.5	399.0	398.0
$\epsilon \times 10^{-4}$ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	3.9	2.4	2.4	2.2	1.7	1.7	2.0
λ_{fl} (nm)	517.0	477.0	475.5	478.5	483.5	482.5	481.0
ϕ	0.91	0.19	0.16	0.16	0.11	0.15	0.10
τ (ns)	8.69	1.07(86%) 3.62(14%)	0.92(88%) 2.07(12%)	0.96(91%) 2.89(9%)	0.77(60%) 3.82(40%)	0.77(82%) 3.76(18%)	0.78(60%) 3.69(40%)

Absorción (λ_{ab}), longitud de onda de fluorescencia (λ_{fl}), absorción molar (ϵ), rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) y tiempo de vida (T).

❖ BODIPYs con nitrógeno como espaciador procedentes del par *BODIPY-alquino/carbohidrato-azida*.

La presencia de un grupo amino electrodonador sobre C-8, promueve una deslocalización π tipo hemicianina que causa un desplazamiento importante a la región azul del espectro.³⁰⁰ Adicionalmente, se observó en éstos una respuesta fluorescente

²⁹⁹ a) Chen, J.; Burghart, A.; Derecskei-Kovacs, A.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2900-2906. b) Zheng, Q.; Xu, G.; Prasad, P. N. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5812-5809. c) Durán-Sampedro, G.; Agarrabeitia, A. R.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Bañuelos, J.; Arbeloa, T.; López Arbeloa, I.; Chiara, J. L.; Ortiz, M. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 6335-6350. d) Ortiz, M. J.; Agarrabeitia, A. R.; Durán-Sampedro, G.; Bañuelos, J.; Arbeloa, T.; Massad, W. A.; Montejano, H. A.; García, N. A.; López Arbeloa, I. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 1153-1162.

³⁰⁰ a) Gómez-Durán, C. F. A.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Martín, V.; Sastre, R.; Bañuelos, J.; López Arbeloa, F.; López Arbeloa, I.; Peña-Cabrera, E. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5103-5105.

altamente sensible a las propiedades del disolvente (Tabla 8). Como resultado, en disolventes polares (por ejemplo, agua) el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuyó drásticamente (desde 0.80 hasta 0.10) y las curvas de decaimiento llegaron a ser multiexponenciales con tiempos de vida muy rápidos (por debajo de los 100 ps). Este comportamiento puede ser atribuido al abatimiento de la fluorescencia por un estado de transferencia de carga intramolecular (ICT, por sus siglas en inglés)³⁰¹ debido al carácter fuertemente electrodonador de la amina.

Por lo tanto, estos derivados no sólo son adecuados para su uso como marcadores biológicos en la zona azul del espectro, sino que además podrían ser aplicados como sensores de polaridad para monitorizar las características del medio, debido a la sensibilidad de la eficiencia de fluorescencia con la polaridad del disolvente.

ii) Propiedades láser

Las propiedades láser de los nuevos derivados del BODIPY fueron estudiadas bajo un bombeo a 355 nm, al tratarse de la longitud de onda usual para colorantes que emiten en la región azul/verde de la zona visible del espectro (Tabla 9).

En la Tabla 9 se muestran las eficiencias láser (la proporción entre la energía de salida del colorante láser y la energía incidente de la bomba sobre la superficie de la muestra) y la longitud de onda del pico de emisión de los diferentes compuestos sintetizados en diferentes disolventes.

Debido a las condiciones experimentales empleadas en este estudio (excitación transversal y enfoque fuerte del bombeo de radiación entrante), la concentración de los colorantes en los diferentes disolventes debe ser alta, en el rango milimolar, de modo que la radiación entrante bombeada penetre la muestra (es decir se absorba) una profundidad similar a la del espesor de la banda de la bomba en la cara de entrada de la celda en la que la radiación de bombeo se centra (aproximadamente 0,3 mm). Esto da lugar a un haz emitido con sección transversal casi circular y optimiza la eficiencia de la eficiencia láser.

b) Bañuelos, J.; Martín, V.; Gómez-Durán, C. F. A.; Arroyo-Cordoba, I. J.; Peña-Cabrera, E.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Pérez-Ojeda, M. A.; Arbeloa, T.; López Arbeloa, I. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 7261-7270.

³⁰¹ ICT es el fenómeno responsable de un fuerte desplazamiento de Stokes o bandas de fluorescencia adicionales en moléculas que contienen dos fluoróforos.

Las eficiencias láser de los colorantes correlacionaron bien con sus propiedades fotofísicas en soluciones diluidas (Tabla 9). El compuesto **252** presenta una buena solubilidad tanto en disolventes polares como apolares con eficiencias láser entre 24-32% (Tabla 10), y con rendimientos cuánticos similares en todos los disolventes. Los compuestos **244-246** y **247-249**, no son solubles en disolventes apolares a las altas concentraciones necesarias para obtener la emisión láser en las condiciones de bombeo empleadas.

Tabla 9. Eficiencia láser y longitud de onda del pico de emisión de los compuestos **244**, **245**, **246**, **247**, **248**, **249**, **252** en diferentes disolventes.

<i>Compuesto / Disolvente</i>	<i>C mM</i>	<i>Eff (%)</i>	<i>λ_{laser} (nm)</i>	<i>Compuesto / Disolvente</i>	<i>C mM</i>	<i>Eff (%)</i>	<i>λ_{laser} (nm)</i>
244 Acetato de etilo Acetonitrilo	4.5	26 25	469 467	247 Etanol Trifluoroetanol Metanol	7	12 6 8	458 461 459
245 Acetato de etilo THF Metanol Etanol Trifluoroetanol Acetonitrilo	2.5	26 25 18 16 19 25	475 468 471 470 473 470	248 Etanol Trifluoroetanol Metanol	16	18 23 19	470 473 469
246 Acetato de etilo Acetonitrilo	3.7	23 24	463 460	249 Etanol Metanol	3.7	18 12	466 464
252 Acetato de etilo Cloroformo THF Acetonitrilo	2	28 24 26 32	547 546 548 545				

El compuesto **248** fue estudiado en solventes polares apróticos y en solventes polares próticos. Las eficiencias láser fueron aproximadamente del 25% en solventes polares apróticos y cayeron hasta un 16% en los polares próticos, resultando congruentes con los datos fotofísicos.

Los compuestos **244** y **246** mantienen eficiencias láser de aproximadamente 25% en disolventes polares apróticos, con rendimientos cuánticos de fluorescencia similares al compuesto **245** en éste tipo de disolventes. Las propiedades láser de los compuestos **247-249** pudieron ser estudiadas únicamente en disolventes polares próticos por problemas de solubilidad. En disolventes polares próticos los procesos no radiantes de esos derivados son importantes, resultando en rendimientos cuánticos de fluorescencia por debajo de 0.3 (Tabla 9), lo cual se refleja en eficiencias láser bajas de hasta un 6%.

La estabilidad láser bajo un bombeo repetido de estos derivados, la cual es un parámetro importante para prácticamente cualquier aplicación práctica de éstos colorantes como colorantes láser, fue estudiada para disoluciones en acetonitrilo (compuestos **244-246**) y etanol (compuestos **247-249**). En la Tabla 10 se encuentran recogidas las disminuciones de la emisión de fluorescencia inducida por láser, de los diferentes compuestos con el número de pulsos de la bomba a una velocidad de repetición de 5 Hz. En la Figura 41, se compara la evolución real de la emisión de fluorescencia inducida por láser de los compuestos **244** y **247** bajo un bombeo a 5 Hz con pulsos de 5 mJ. La fotoestabilidad de esos compuestos refleja la importancia de los procesos no radiantes en la evolución a largo plazo de su emisión. La constante de velocidad de la desactivación no radiante es mucho más alta en disolventes polares próticos que en los apolares y polares apróticos y, por lo tanto, todos los compuestos disueltos en etanol muestran una estabilidad mucho menor que aquellos disueltos en acetonitrilo.

Tabla 10. Estabilidad láser de los compuestos **252**, **244-246** en acetonitrilo y de los compuestos **247-249** en etanol. Energía de la bomba y la velocidad de repetición: 5 mJ y 5 Hz respectivamente.

Compuesto	252	244	245	246	247	248	249
ln (%) ^a	25	24	15	10	25	28	20
[n]	[50000]	[50000]	[50000]	[50000]	[15000]	[15000]	[15000]

^a ln (%): porcentaje de la intensidad de salida del láser después de [n] pulsos de la bomba, referidos a la intensidad inicial I_0 ; $\ln(\%) = (I_0/I_n) \times 100$.

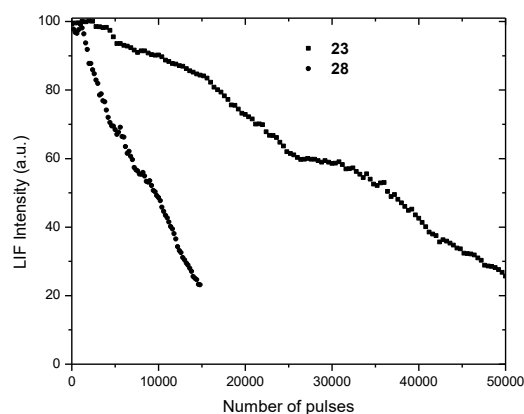


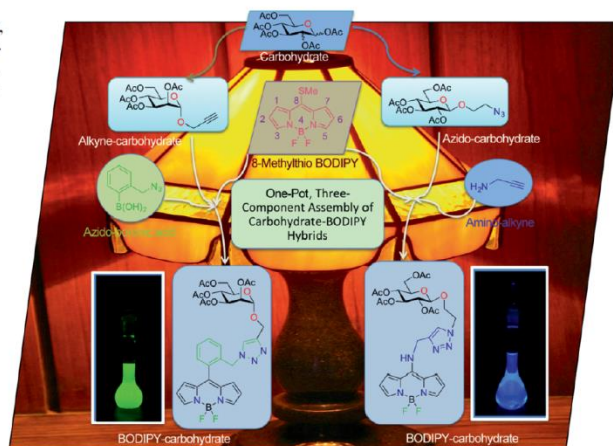
Figura 41 Emisión de fluorescencia inducida por láser normalizada como función del número de pulsos de la bomba a una velocidad de repetición de 5 Hz de una solución de acetonitrilo del colorante **244** (cuadros) y en etanol (+).

Los resultados de éste trabajo fueron publicados en la revista *European Journal of Organic Chemistry* y constituyó la portada del segundo número del mes de septiembre del 2014.



COVER PICTURE

The cover picture shows two concise, complementary, protocols for the one-pot, three-component assembly of an alkyne- or azido-carbohydrate, 8-thiomethyl BODIPY, and either propargylamine or an azido boronic acid, respectively, which allow access to fluorescent carbohydrate-BODIPY hybrids. These carbohydrate-BODIPY hybrids display excellent photophysical and laser properties that relate to the spacer employed (amino group or aromatic ring). Details are discussed in the Short Communication by J. C. Lopez, J. Bañuelos, E. Peña-Cabrera et al. on p. 5659ff.



Eur. J. Org. Chem. 2014, 5617–5624

www.eurjoc.org

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

5617

II.4.4 Conjugación de BODIPYs a moléculas portadoras de grupos amino

II.4.4.1 Funcionalidad azida y reacción de Staudinger en el marcaje de biomoléculas

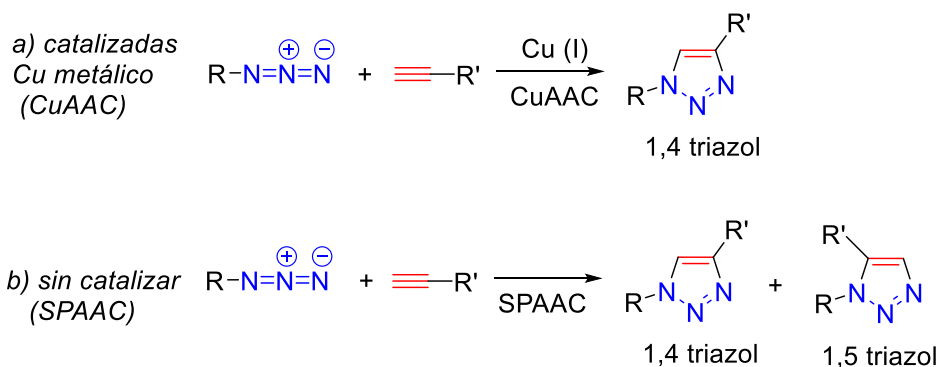
Las azidas constituyen un tipo de funcionalidad química que se han mostrado de una enorme utilidad, no sólo en síntesis orgánica,³⁰² sino también para el marcaje de biomoléculas, tanto para su uso en estudios *in vitro* como para ensayos *in vivo*. La funcionalidad azida es químicamente inerte, es correctamente tolerada por células y organismos, y además siendo sólo débilmente electrófila no reacciona con aminas y otros nucleófilos abundantemente representados en los sistemas biológicos. De todas las funcionalidades posibles, probablemente las azidas se han constituido como el grupo reactivo por excelencia para efectuar reacciones de bioconjugación.

Como ya se ha puesto de manifiesto a lo largo de esta memoria, dada la alta versatilidad, selectividad y eficiencia de la reacción de cicloadición alquino-azido catalizada por cobre, esta estrategia se aplicó ampliamente en diferentes áreas para obtener sistemas conjugados complejos. Se generan 1,2,3-triazoles 4-sustituidos de gran estabilidad (Esquema 74a). Sin embargo, una desventaja fundamental de la reacción de CuAAC es el uso de cobre como catalizador, el cual puede tener efectos citotóxicos severos y puede modificar el delicado balance metabólico de los sistemas biológicos en estudios celulares o *in vivo*. Además, en aquellos casos donde la estructura final de un potencial fármaco contiene grupos funcionales capaces de quelar

³⁰² Brase, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 5188-5240.

iones cobre, la eliminación de dichos iones puede ser complicada, limitando así su uso terapéutico.³⁰³

Reacciones de Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos ("Reacciones de Huisgen") (CuAAC)



Esquema 74. Conjugación con azidas basada en reacciones de cicloadición³⁰⁴.

Recientemente, se han propuesto otras interesantes alternativas que implican una cicloadición pero que evitan el uso de catalizadores metálicos. En este grupo se incluyen reacciones favorecidas por la reducción de una tensión de anillo (conocidas habitualmente como SPAAC de "Strain-Promoted Alkyne Azide Cycloaddition) y que emplean sistemas de ciclooctino,³⁰⁵ oxanorbornadienos,³⁰⁶ y dibenzociclooctinos³⁰⁷ (Esquema 74b). En comparación con la CuAAC, estas nuevas reacciones de cicloadición son experimentalmente sencillas, muy rápidas en ausencia de catalizador, no generan productos colaterales ni requieren el uso de aditivos, aunque no son regioselectivas y originan los triazoles 1,4 y 1,5-disustituidos regioisoméricos.

El potencial de las azidas en la conjugación de dos entidades no se ha limitado exclusivamente a reacciones de cicloadición, sino que alternativamente se han

³⁰³ Gaetke L. M.; Chow, C. K. *Toxicology*, **2003**, 189, 147-163.

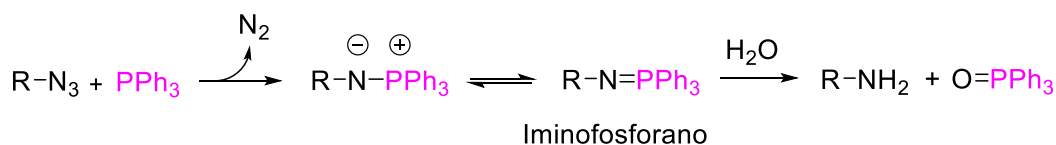
³⁰⁴ Schilling, C. I.; Jung, N.; Biskup, M.; Schepers, U.; Brase, S. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 4840-4871.

³⁰⁵ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15046-15047. b) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *ACS Chem. Biol.*, **2006**, 1, 644-648. c) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 16793-16797. d) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3097-3099. e) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. *Aldrichimica Acta*, **2010**, 43, 15-23.

³⁰⁶ a) van Berkel, S. S.; Dirks, A. J.; Debets, M. F.; van Delft, F. L.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M.; Rutjes, F. P. J. T. *ChemBioChem*, **2007**, 8, 1504-1508; b) van Berkel, S. S.; Dirks, A. J.; Meeuwissen, S. A.; Pinggen, D. L. L.; Boerman, O. C.; Laverman, P.; van Delft, F. L.; Cornelissen, J. J. L. M.; Rutjes, F. P. J. T. *ChemBioChem*, **2008**, 9, 1805-1815.

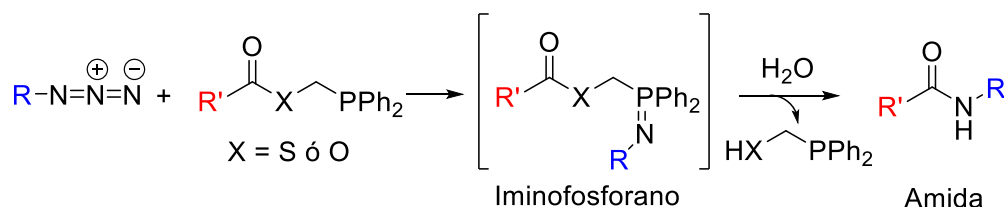
³⁰⁷ Ning, X. H.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 2253-2255.

propuesto otras posibilidades que transcurren de manera selectiva y que se basan en una reacción de tipo Staudinger (Esquema 75).



Esquema 75. Reacción clásica de Staudinger entre una fosfina y una azida.

En 1919, Staudinger y Meyer describieron la reacción espontánea entre una azida orgánica y triarilfosfina (PPh_3) para generar, tras evolución de nitrógeno gas, un intermedio iminofosforano que, en presencia de agua, es hidrolizado para producir una amina primaria y óxido de triarilfosfina (Esquema 75).³⁰⁸ Basándose en esta reacción, Bertozzi³⁰⁹ y Raines³¹⁰ propusieron una variante bioortogonal³¹¹ e introdujeron fosfinas modificadas que contenían en su estructura un grupo éster susceptible de reaccionar con el iminofosforano de forma intramolecular originando un enlace de tipo amida en lo que ha sido denominada la “ligación de Staudinger” (Esquema 76). Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para la conjugación de etiquetas químicas a diferentes biomoléculas incluyendo glicanos, péptidos, proteínas y enzimas.³¹²



Esquema 76. Ligación de Staudinger basada en reacciones de azidas

³⁰⁸ Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta*, **1919**, 2, 635-646.

³⁰⁹ a) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science*, **2000**, 287, 2007-2010. b) Gilbertson, S. *Chemtracts*, **2001**, 14, 524-528; c) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 19-24.

³¹⁰ a) Nilsson, B. L.; Kiessling L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.*, **2000**, 2, 1939-1941. b) Tam, A.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 1173-1175.

³¹¹ El término bioortogonalidad engloba a aquellas reacciones que ocurren de manera eficiente bajo condiciones fisiológicas donde sus componentes son compatibles con funcionalidades biológicas. Por tanto, las reacciones bioortogonales deben cumplir una serie de requisitos, entre otros: el/los reactivos no deben ser sensibles a la química redox debido al medio reductor del citosol; la reacción no puede llevarse a cabo a alta temperatura, presión o concentración; el/los reactivos no deben presentar toxicidad y sus funcionalidades no deben ser susceptibles a ataques nucleofílicos debido a la abundancia de grupos aminos y tioles presentes en las células.

³¹² van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 8806-8827.

El mecanismo de la reacción de Staudinger ha sido extensamente estudiado empleando métodos experimentales³¹³ y computacionales³¹⁴ y se ha demostrado que transcurre vía diferentes intermedios de reacción.³¹⁵ El primer paso implica un ataque nucleófilo del átomo de fósforo de la fosfina **B** al grupo azida **A** para originar el intermedio fosfazida **I** (Esquema 77). En un paso posterior, la fosfazida experimenta una ciclación intramolecular facilitando la formación de un estado de transición cíclico de cuatro miembros **II**, que por pérdida de nitrógeno origina el iminofosforano ó fosfaceno **III**, en el que el átomo de nitrógeno posee una hibridación trigonal y el fósforo, tetraédrica y que puede ser representado por las formas resonantes **IIIa** ó **IIIb**. Según los datos espectroscópicos, el enlace N-P en los fosfacenos tiene un elevado carácter de doble enlace, con un solapamiento del orbital 2p ocupado del nitrógeno con el orbital vacante 3d_{xy} o 3d_{xz} del fósforo, produciendo un orden de enlace próximo a 2.³¹⁶ Este valor oscila según la naturaleza de los sustituyentes de ambos átomos, lo que tiene consecuencias en la estabilidad, basicidad y carácter nucleófilo de cada iminofosforano.

La reacción de Staudinger puede entonces ser una reacción de primer ó segundo orden dependiendo de si la fase limitante de la reacción es la descomposición unimolecular o la formación bimolecular de la fosfazida. En presencia de agua, el iminofosforano **III**, es hidrolizado habitualmente para generar la amina **C** y el óxido de fosfina (Esquema 77, Ruta A). Esta reacción es denominada reducción de Staudinger y es una transformación que se realiza de forma rutinaria en síntesis orgánica para la producción de aminas.³¹⁷

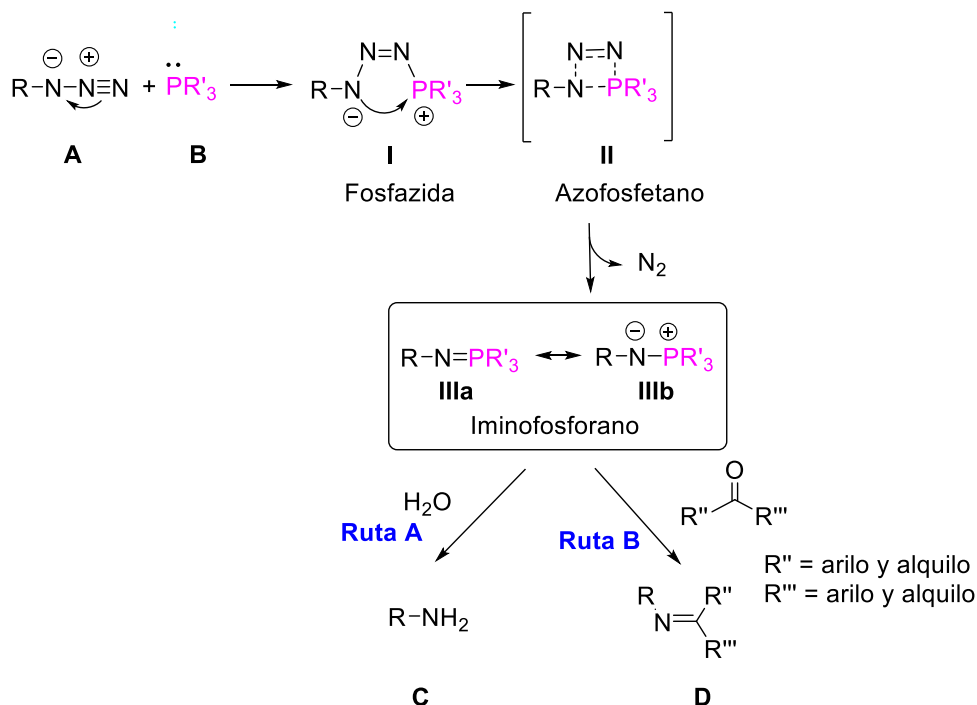
³¹³ Gololobov, Y. G.; Zhmurova, L. N.; Kasukhin, L. F. *Tetrahedron*, **1981**, 37, 437-472.

³¹⁴ a) Tian, W. Q.; Wang, Y. A. *J. Chem. Theory Comput.*, **2005**, 1, 353-362. b) Widauer, C.; Grützmacher, H.; Shevchenko, I.; Gramlich, V. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1999**, 1659-1664.

³¹⁵ Leffler, J. E.; Temple, R. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 5235-5246.

³¹⁶ Johnson, W. *Ylides and Imines of Phosphorous*, Wiley, New York, **1993**, 414.

³¹⁷ Gololobov, Y. G.; Kasukhin, L. F. *Tetrahedron*, **1992**, 48, 1353-1406.



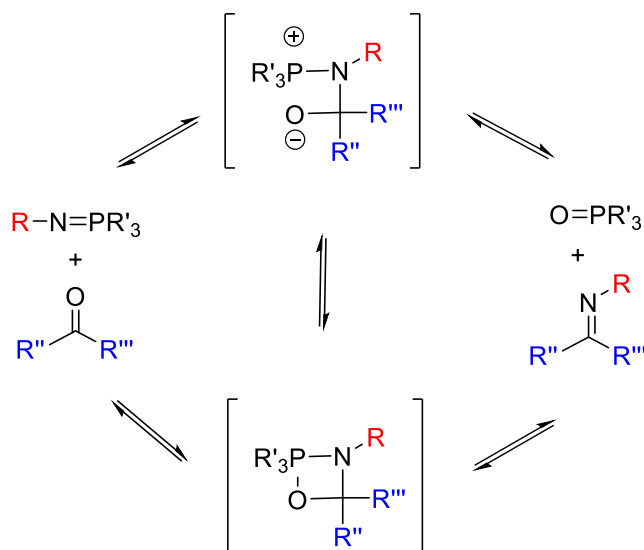
Esquema 77. Mecanismo de la reacción de Staudinger. Ruta A: adición de H_2O (como nucleófilo) dando lugar a la reducción clásica de Staudinger. Ruta B: adición de un aldehído o cetona para formar una imina.

Alternativamente, el átomo de nitrógeno nucleófilo del iminofosforano (ver forma resonante **IIIb**) puede reaccionar con diferentes compuestos electrofílicos en lo que constituyen las diferentes variantes de la reacción de Staudinger. Cuando el iminofosforano **III** reacciona con aldehídos, o cetonas se originan las correspondientes iminas **D**. Debido a la similitud que presenta la reacción con la que tiene lugar entre iluros de fósforo y compuestos carbonílicos, se ha generalizado el uso del nombre de reacción “aza-Wittig” (Esquema 77, Ruta B).³¹⁸ El área de aplicación más importante de esta reacción lo encontramos en la síntesis de compuestos acíclicos y heterocíclicos.³¹⁹

³¹⁸ Staudinger, H.; Hauser, E. *Helv. Chim. Acta*, **1921**, 4, 861–886.

³¹⁹ a) Molina, P.; Aller, E.; Lorenzo, A.; López-Cremades, P.; Rioja, I.; Úbeda, A.; Terencio, M. C.; Alcaraz, M. J. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 1011-1014. b) Palacios, F.; Alonso, C.; Rodríguez, M.; de Marigorta, E. M.; Rubiales, G. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 1795-1804. Reviews de la reacción Staudinger/aza-Wittig, ver: a) Palacios, F.; Alonso, C.; Aparicio, D.; Rubiales, G.; de los Santos, J. M. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 523-575. b) Eguchi, S. *ARKIVOC*, **2005**, ii, 98-119. c) Loos, P.; Riedricha, M.; Arndt, H.-D. *Chem. Commun.*, **2009**, 14, 1900-1902. d) Attanasi, O. A.; Bartocchini, S.; Favi, G.; Filippone, P.; Perrulli, F. R.; Santeusano, S. *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 9338-9343. e) Molina, P.; Vilaplana, M. *J. Synthesis*, **1994**, 1197-1218. f) Fresneda, P. M.; Molina, P. *Synlett*, **2004**, 1-17. g) Fresneda, P. M.; Molina, P.; Delgado, S. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 6197-6202.

Aunque existe poca información sobre el mecanismo detallado de la reacción aza-Wittig, se admite que debe ser similar al de la reacción de olefinación de Wittig³²⁰ y para tratar de explicar las observaciones experimentales se han utilizado diferentes estudios computacionales.³²¹ Así, se considera que la condensación entre el iminofosforano y el compuesto carbonílico genera un intermedio cíclico de cuatro miembros (oxafosfetano), con posterior descomposición para generar la correspondiente imina mediante la eliminación de óxido de fosfina (Esquema 78).



Esquema 78. Mecanismo de la reacción Aza- Wittig.

Por otra parte, los isocianatos ($R-NCO$), son productos de partida de gran interés industrial³²² que fueron descubiertos por Wurtzen 1849,³²³ y para los que se conocen diferentes procedimientos de síntesis. El método tradicional implica el tratamiento de aminas con fosgeno, frecuentemente a elevadas temperaturas (Esquema 79a).³²⁴ Una propuesta adicional llega en 1967 cuando el grupo de Collman describe la obtención de isocianatos mediante la carbonilación de azidas en presencia de complejos metálicos de

³²⁰ Johnson, A. W.; Kahsa, W. C.; Starzewski, K. A. O.; Dixon, D. A. *Ylides and Imines of Phosphorus*; Johnson, A.W., Ed.; Wiley, New York, NY, **1993**, 13.

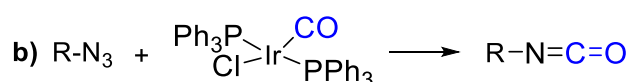
³²¹ a) Cossio, F.; Alonso, C.; Lecea, B.; Ayerbe, M.; Rubiales, G.; Palacios, F. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 2839-2847. b) Xue, Y.; Kim, C. K. *J. Phys. Chem. A*, **2003**, 107, 7945-7951. c) Xue, Y.; Xie, D.; Yan, G. *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 9053-9058. d) Lu, W. C.; Sun, C. C.; Zang, Q. J.; Liu, C. B. *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, 311, 491-498. e) Lu, W. C.; Liu, C. B.; Sun, C. C. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, 103, 1078-1083. f) Koketsu, J.; Ninomiya, Y.; Suzuki, Y.; Koga, N. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 694-702.

³²² Estos derivados, tienen gran importancia en la fabricación de poliuretanos, en la manufactura de elastómeros, de adhesivos, de agroquímicos y de fármacos. Ver: Decicco, C. P.; Seng, J. L.; Kennedy, K. E.; Covington, M. B.; Welch, P. K.; Arner, E. C.; Magolda, R. L.; Nelson, D. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 2331-2336.

³²³ Wurtz, A. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1849**, 71, 326-342.

³²⁴ a) Twitchett, H. *J. Chem. Soc. Rev.*, **1974**, 3, 209-230. b) Nowick, J. S.; Holmes, D. L.; Noronha, G.; Smith, E. M.; Nguyen, T. M.; Huang, S.-L. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3929-3934.

Iridio.³²⁵ Rápidamente se proponen especies de Rh,³²⁶ Pd,³²⁷ Fe,³²⁸ Ni,³²⁹ Au,³³⁰ y W³³¹ como diferentes catalizadores con los que activar esta transformación (Esquema 79b). Sin embargo, la elevada toxicidad de ambos procesos, debido a la presencia del fosgeno y a la cantidad de HCl corrosivo liberado en el primer método, y a la necesidad de emplear monóxido de carbono en el segundo, hizo deseable el disponer de métodos alternativos para la síntesis de isocianatos.



Esquema 79. Métodos de síntesis de isocianatos a) reacción de una amina con fosgeno, b) reacción entre una azida y CO, c) Reacción Staudinger/Aza-Wittig

La alternativa actual, limpia y segura para la síntesis de isocianatos la constituye la modificación de la reacción de Staudinger/Aza-Wittig (en la que el iminofosforano obtenido a partir de la correspondiente azida, se hace reaccionar con dióxido de carbono que no es tóxico, es muy abundante y económico (Esquema 79c). La reacción es compatible con una variedad de grupos funcionales y los isocianatos se suelen obtener con buen rendimiento. Molina y colaboradores describieron esta reacción

³²⁵ Collman, P.; Kubota, M.; Hosking, J. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 4809-4811.

³²⁶ La Monica, G.; Aadizzola, G. *J. Mol. Catal.*, **1986**, 38, 327-302.

³²⁷ a) Valli, V. L. K.; Alper, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3778-3779. b) Alessio, E.; Mestroni, G. *J. Organomet. Chem.*, **1985**, 291, 117-127. c) Izumi, Y.; Satoh, Y.; Kondoh, H.; Yrabe, K. *J. Mol. Catal.*, **1992**, 72, 37-46. d) Izumi, Y.; Satoh, Y.; Urabe, K. *Chem. Lett.*, **1990**, 5, 795-796. e) Kelkar, A. A.; Kolhe, D. S.; Kanagasabapathy, S.; Chaudhari, R. V., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1992**, 31, 172-226. f) Wehman, P.; Kamer, P. C. J.; van Leeuwen, P. W. N. M. *Chem. Commun.*, **1996**, 217-218. g) Pri-Bar, I.; Schwartz, J. *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 8124-8125. h) Valli, V. L. K.; Alper, H. *Organometallics*, **1995**, 14, 80-82. i) Wehman, P.; Kaasjager, V. E.; de Lange, W. G. J.; Hartl, F.; Kamer, P. C. J.; van Leeuwen, P. W. N. M. *Organometallics*, **1995**, 14, 3751-3761. j) Bigi, F.; Maggi, R.; Sartori, G. *Green Chem.*, **2000**, 2, 140-148.

³²⁸ Ugo, R.; Psaro, R.; Pizzotti, M.; Nardi, P.; Dossi, C.; Andreetta, A.; Capparella, G. *J. Organomet. Chem.*, **1991**, 417, 211-233.

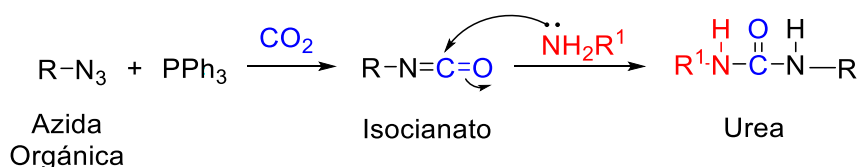
³²⁹ a) Hoberg, H.; Fañanas, F. J.; Riegel, H. J. *J. Organomet. Chem.*, **1983**, 254, 267-271. b) Giannoccaro, P.; Nobile, C. F.; Mastroli, P.; Ravasio, N. *J. Organomet. Chem.*, **1991**, 419, 251-258.

³³⁰ a) Shi, F.; Deng, Y. Q.; Yang, H. Z.; SiMa, T. L. *Chem. Commun.*, **2001**, 345-346. b) Shi, F.; Deng, Y. Q. *Chem. Commun.*, **2001**, 443-444. c) Shi, F.; Deng, Y. Q. *J. Catal.*, **2002**, 211, 548-551.

³³¹ a) McCusker, J. E.; Abboud, K. A.; McElwee-White, L. *Organometallics*, **1997**, 16, 3863-3866. b) Lee, L.; Chen, D.; Lin, Y.; Lo, Y.; Lin, C. H.; Lee, G.; Wang, Y. *Organometallics*, **1997**, 16, 4636-4644. c) McCusker, J. E.; Logan, J. McElwee-White, L. *Organometallics*, **1998**, 17, 4037-4041. d) McCusker, J. E.; Main, A. D.; Johnson, K. S.; Grasso, C. A.; McElwee-White, L. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5216-5222.

burbujeado CO_2 en el medio de reacción ó realizando el proceso en atmósfera de dióxido de carbono en un tubo sellado.³³² Empleando dióxido de carbono supercrítico (sCO_2) también se logran buenos rendimientos de los correspondientes isocianatos en tiempos razonables de reacción.³³³ Especialmente interesante, por la sencillez en la manipulación, resulta la propuesta de Azhayev y col. en la que describen como fuente de dióxido de carbono una solución tamponada de bicarbonato de trietilamonio (TEAB).³³⁴ Si se reemplaza el dióxido de carbono por disulfuro de carbono (CS_2), se obtienen son los correspondientes isotiocianatos, de menor reactividad que los isocianatos.

El grupo isocianato contiene un átomo de carbono altamente electrofílico que puede ser atacado por diferentes grupos nucleófilos. De acuerdo con esta reactividad, una aplicación fundamental de los isocianatos, consiste en el marcaje fluorescente de proteínas y anticuerpos gracias a su elevada reactividad frente a grupos amino. Dado que los isocianatos, se suelen sintetizar a partir de las azidas correspondientes, por una reacción de Staudinger/aza-Wittig con CO_2 , el proceso global de síntesis de isocianato y posterior reacción con aminas, puede considerarse un método de conjugación de azidas con moléculas portadoras de grupos amino en las que la unión se establece por una funcionalidad tipo urea y que recientemente ha sido denominada como “ureación de Staudinger” (Esquema 80).³³⁵



Esquema 80. Reacción de “ureación” de Staudinger

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, y dado que los isocianatos y isotiocianatos son dos funcionalidades empleadas habitualmente para el marcaje de proteínas, anticuerpos, péptidos y aminas de pequeño tamaño decidimos como complemento a la conjugación de derivados de BODIPY/carbohidratos vía CuAAC que habíamos estudiado en la sección anterior, el ensayar reacciones de Staudinger-Aza-

³³² Molina, P.; Alajarin, M.; Tamiaki, H. *Synthesis*, 1982, 596-597.

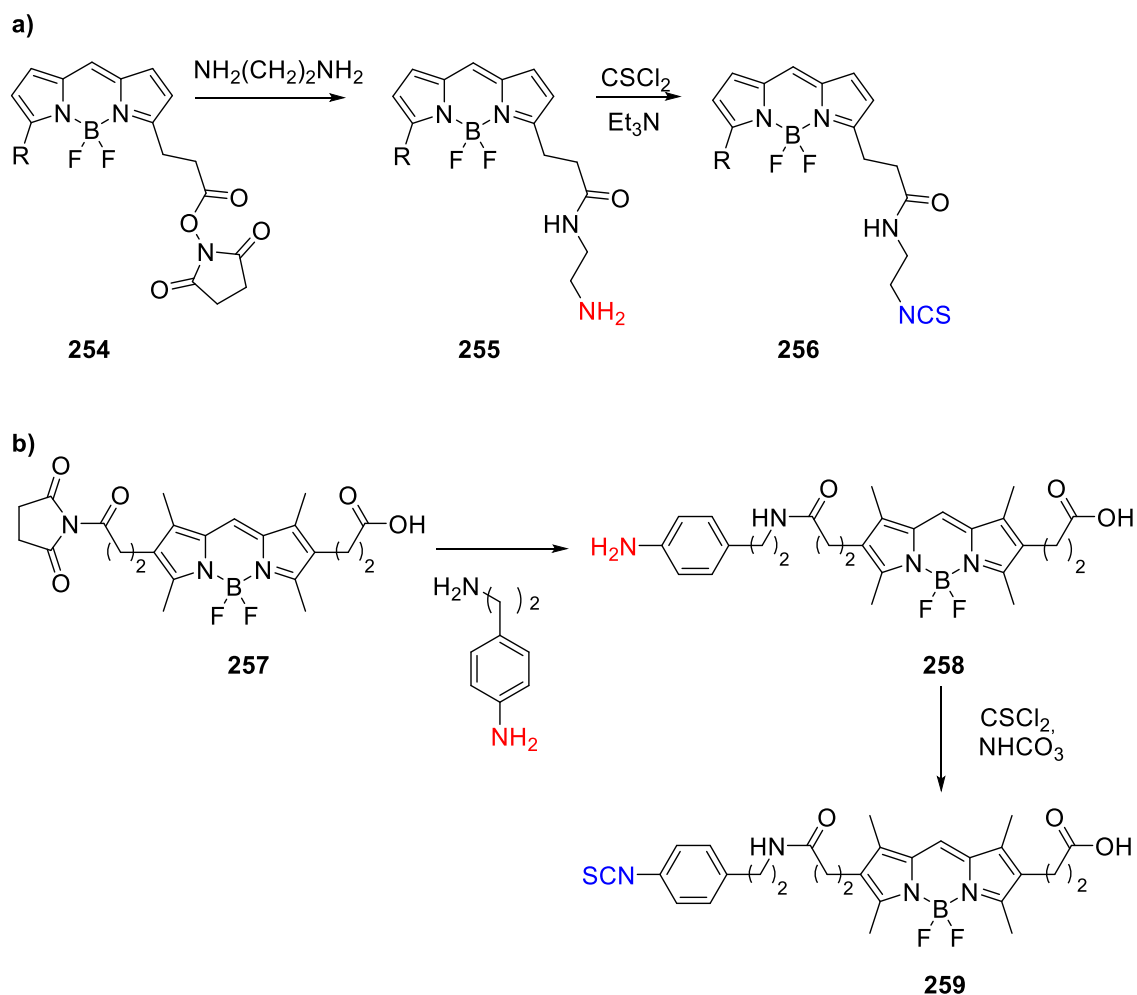
³³³ Menuel, S.; Wagner, M.; Barth, D.; Marsura, A. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 3307-3309.

³³⁴ Yagodkin, A.; Lösckke, K.; Weisell, J.; Azhayev, A. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 2210-2221.

³³⁵ a) Godeau, G.; Guittard, F.; Darmanin, T. *Mat. Today Comm.*, **2016**, 8, 165-171. b) Godeau, G.; Boutet, K.; Mortier, C.; Laugier, J.-P.; Guittard, F.; Darmanin, T. *Mater. Des.*, **2017**, 114, 116-122.

Wittig para el marcaje de moléculas portadoras de grupos amino con isocianatos (o isotiocianatos) derivados de nuestros BODIPYs.

Hasta el momento son muy escasos los métodos descritos en la literatura para la preparación de derivados de BODIPY que contengan en su estructura la funcionalidad isocianato o isotiocianato. Desde un punto de vista cronológico, los primeros ejemplos corresponden a dos grupos de investigación independientes que describieron los derivados **256** y **259** (Esquema 81a,b). La introducción de las funcionalidades isotiocianato se llevó a cabo por tratamiento con tiofosgeno de los amino-BODIPYs **255** y **258**, respectivamente.^{336,337} El isotiocianato **259** fue posteriormente empleado para marcar fluorescentemente la inmunoglobulina G de ratón.



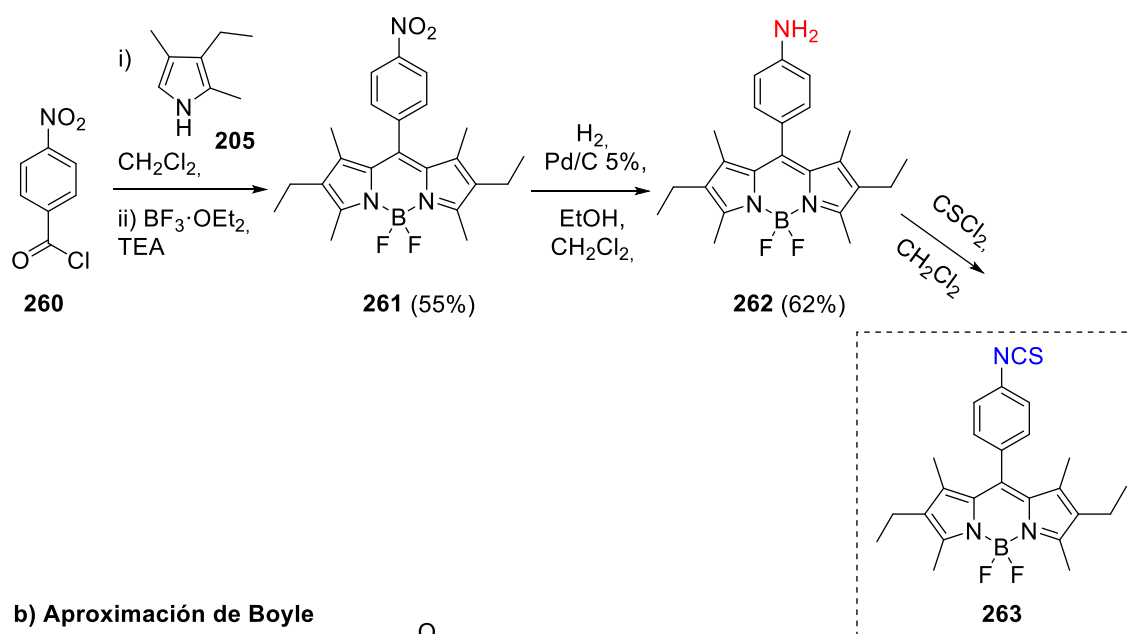
Esquema 81. BODIPYs funcionalizados con isocianatos.

³³⁶ Haugland, R. P.; Kang, H. C. *US Pat.* 4, 774,339 **1988**.

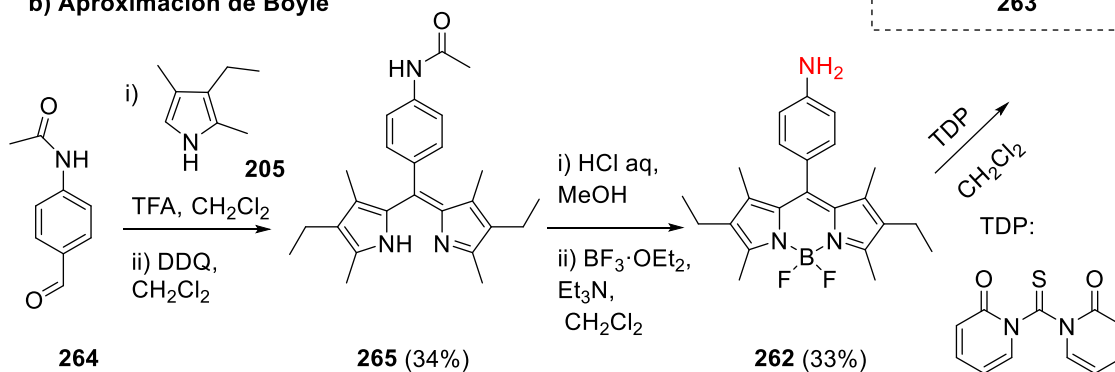
³³⁷ Meltola, N. J.; Soini, A. E.; Hanninen, P. E. *J. Fluoresc.*, **2004**, 14, 129-138.

Alternativamente, los grupos de Ziesse³³⁸ y de Boyle,³³⁹ de forma coetánea pero independiente, sintetizaron el derivado de BODIPY **263** que incorpora el grupo isocianato en posición *para* de un anillo aromático sobre C-8 (Esquema 82). En el primer caso el núcleo principal del cromóforo se construyó a partir de un cloruro de ácido (Esquema 82a), mientras que Boyle y col. emplearon un aldehído aromático (Esquema 82b). Como precursores de la función *para*-aminofenil, Ziesse³³⁸ empleó un grupo nitró (Esquema 82a) y Boyle un grupo acetamido (Esquema 82b). Una vez liberada la amina aromática, por hidrogenación o hidrólisis, ésta es sometida a tiocarbonilación para generar la función isotiocianato en **263**.

a) Aproximación de Ziesse³³⁸



b) Aproximación de Boyle

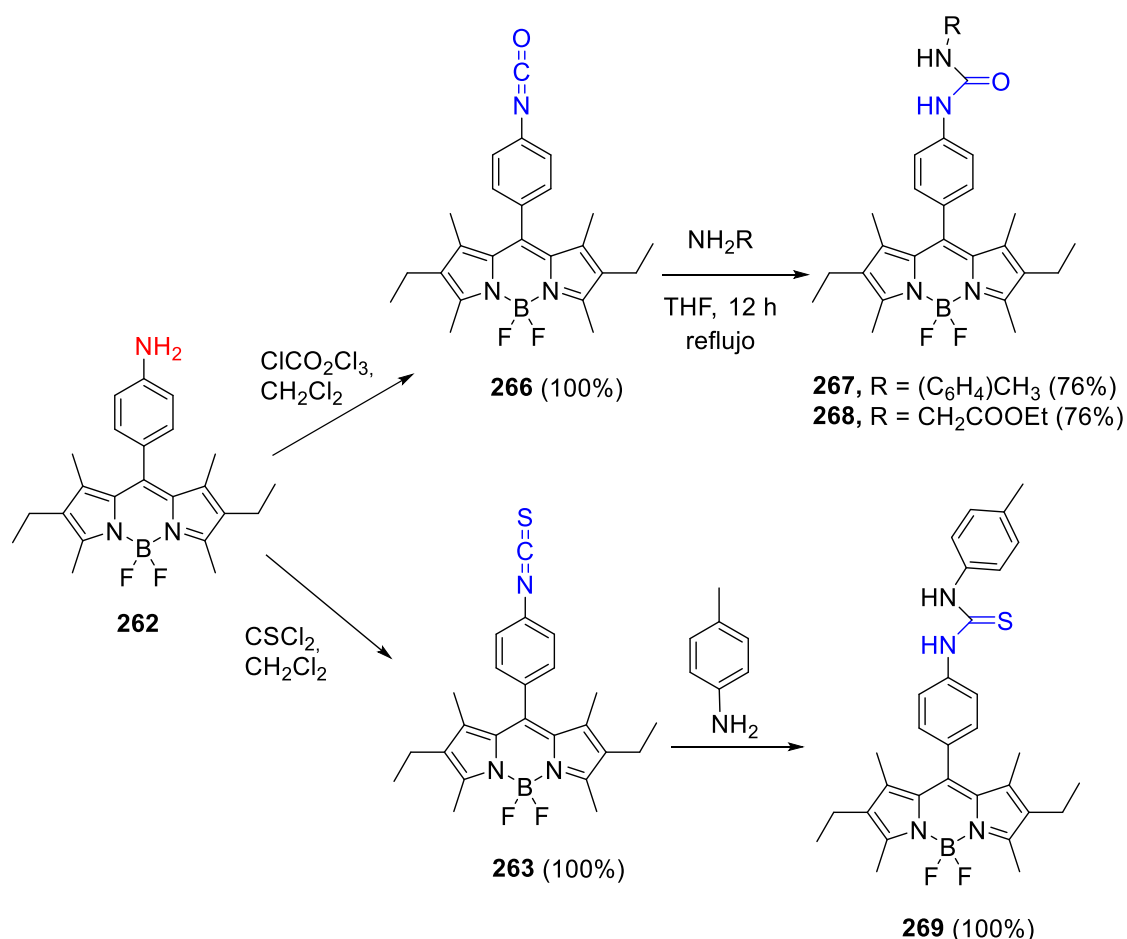


Esquema 82. Aproximaciones a la síntesis del BODIPY-isotiocianato **263**

³³⁸ Ziesse³³⁸, R.; Bonardi, L.; Retailleau, P.; Ulrich, G. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 3093-3102.

³³⁹ Malatesti, N.; Hudson, R.; Smith, K.; Savoie, H.; Rix, K.; Welham, K.; Boyle, R. W.; *Photochem. Photobiol.*, **2006**, 82, 746-749.

Mientras que Boyle y colaboradores ilustraron la utilidad del isotiocianato sintetizado (**263**) en aspectos de tipo biológico (mediante el marcaje de anticuerpos monoclonales del tipo anti-EpCAM y antLCD146), el grupo de Ziessel se centró en una aplicación más química, comparando la reactividad del isotiocianato **263**, con el isocianato **266**, también preparado por ellos, en reacciones de formación de tioureas y ureas, respectivamente (Esquema 83).



Esquema 83. Formación de ureas y tioureas a partir de la amina **262**.

II.4.4.2 Objetivos específicos

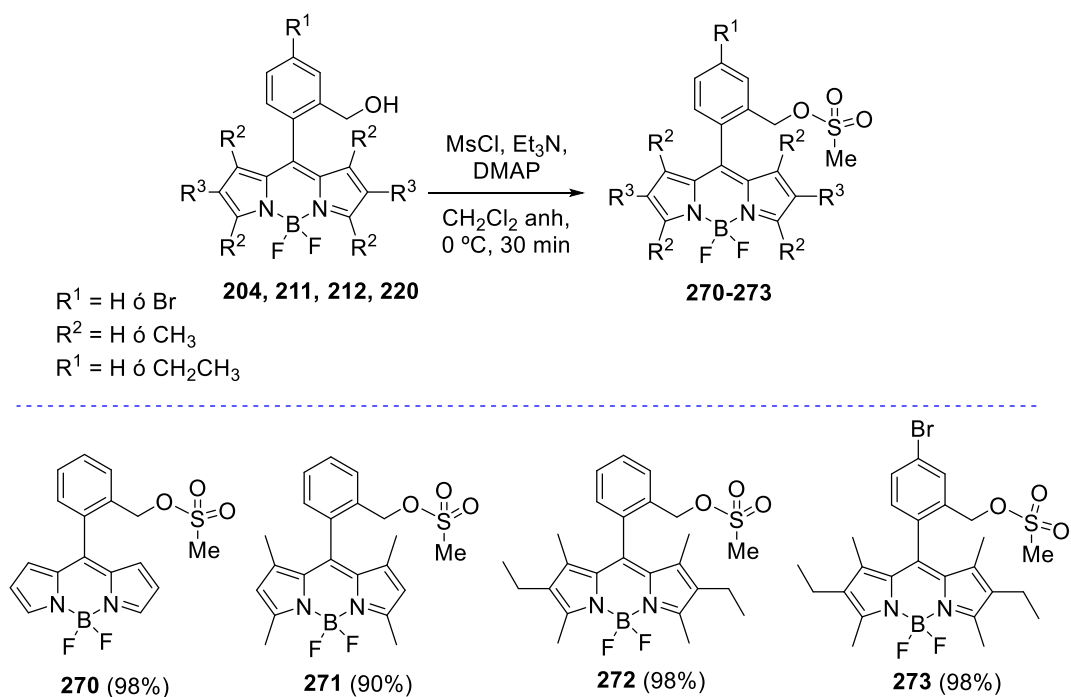
Paralelamente al empleo de azidas para conjugación de moléculas conteniendo grupos alquino, los isocianatos e isotiocianatos han sido dos funcionalidades también habituales para el marcaje de moléculas portadoras de grupos amino, tales como proteínas, péptidos, etc.. Por tanto, como objetivo complementario al desarrollo de las reacciones CuAAC de azidas ya discutidas, nos planteamos ensayar reacciones de Staudinger/Aza-Wittig, para la ligación de 8-azidometilfenil-BODIPYs a moléculas portadoras de grupos amino.

II.4.4.3. Síntesis de azidometilfenil-BODIPYs

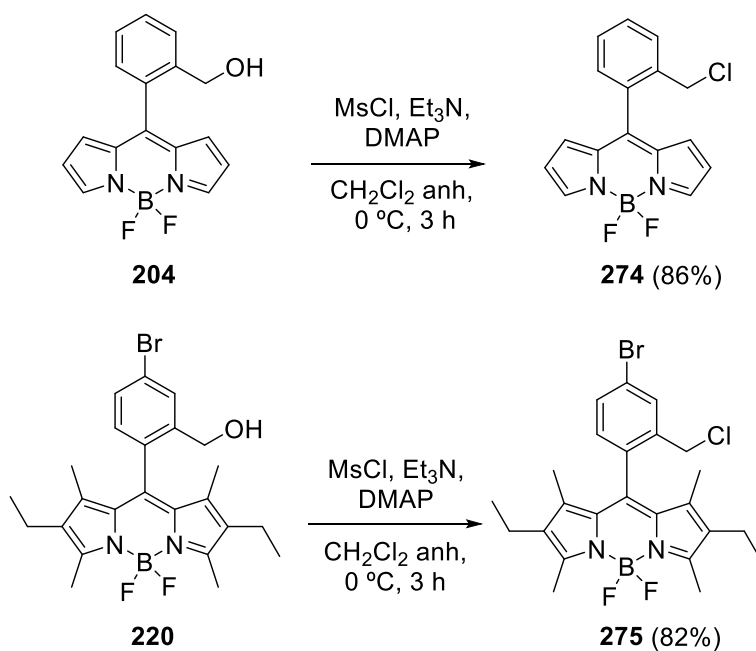
A diferencia de la azida/BODIPY **250** (Figura 39) obtenida mediante el método de Peña-Cabrera y empleada en reacciones de conjugación vía reacciones de CuAAC, las azidas utilizadas en este apartado han sido preparadas a partir de derivados de C8-*orto*-aril-hidroximetil BODIPYs, obtenidos a partir de ftalidas y pirroles.

Para la transformación del grupo hidroximetil en el grupo azidometil hemos explorado dos estrategias alternativas, la primera en un proceso en dos etapas via mesilación de la función hidroxilo y posterior desplazamiento con azida sódica; y una segunda que transcurriría en una única etapa mediante una reacción de tipo Mitsunobu empleando como nucleófilo difenilfosforilazida.

Así, en la primera aproximación, los BODIPYS **204**, **211**, **212** y **220** fueron sometidos a las condiciones habituales de mesilación por disolución en DCM anhidro y posterior tratamiento a 0 °C, y en atmósfera inerte, con cloruro de mesilo (1.5 equiv.), Et₃N (3 quiv.), y en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador. Desde un punto de vista experimental, hemos podido comprobar que: i) los hidroximetil-BODIPYs y los mesilatos presentan R_f idénticos en una variedad de mezclas de disolventes (cromatografía en capa fina), lo cual hace imposible el seguimiento de la transformación por CCF, ii) la reacción transcurre en 30 min. para dar los mesilatos correspondientes (p. ej. **270** y **273**) con rendimientos prácticamente cuantitativos; iii) no es necesaria la purificación de los mesilatos intermedios, que pueden ser directamente empleados en la etapa de sustitución nucleófila para generar los azido-BODIPYs (Esquema 86).

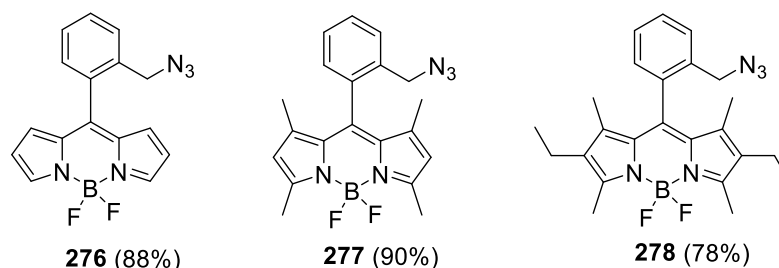
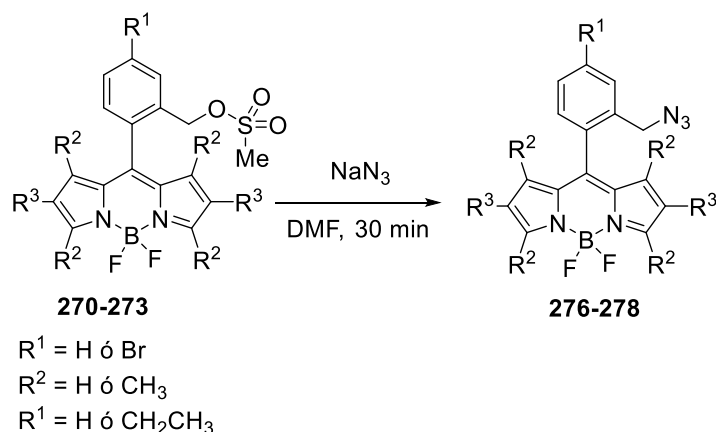
Esquema 84. Síntesis de los mesilatos **270- 273**.

Cuando la reacción de mesilación de los BODIPYs **204** ó **220** se mantiene durante tiempos de reacción superiores a 30 minutos, se puede observar la formación de los mesilatos **270** ó **273**, pero también la formación de los derivados clorados **274** ó **275**. Si la reacción se mantiene durante 3 horas, los derivados clorados **274** y **275** son obtenidos como únicos productos de reacción con buenos rendimientos globales. Estos derivados se deben originar por sustitución nucleófila de los mesilatos intermedios **270** ó **273** por los iones cloruro presentes en el medio de reacción (Esquema 85).



Esquema 85. Obtención de los clorometil-BODIPYs **274** y **275**.

A continuación los mesilatos **270-273** fueron disueltos en dimetilformamida y tratados con NaN_3 . Tras 12 horas de reacción, elaboración y posterior cromatografía en columna se obtuvieron las azidas **276**, **277** y **278** con buenos rendimientos. Sin embargo, la reacción análoga del mesilato **273** (para-bromo arilo) no condujo a la azida esperada (**279**, ver Esquema 87), observándose descomposición del material de partida.



Esquema 86. Síntesis de las azidas-BODIPYs **276-278**.

En este contexto, y con el fin de tener acceso al derivado **279**, decidimos explorar una segunda estrategia basada en una reacción de tipo Mitsunobu a partir del hidroximetil BODIPY **220** (Esquema 87).³⁴⁰ Aunque la reacción de Mitsunobu es una transformación bien establecida para invertir la estereoquímica de alcoholes secundarios (vía desplazamiento nucleófilo de un alcohol activado por el aducto resultante de una fosfina terciaria y un azodicarboxilato), también se ha empleado para la transformación directa de grupos hidroxilo en azidas.³⁴¹ De acuerdo con esto, decidimos emplear difenilfosforilazida (DPPA)³⁴² como nucleófilo para la introducción directa de la función azida sobre **220**.

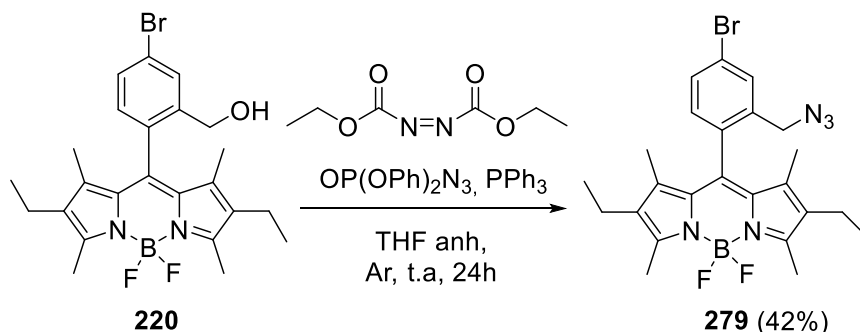
De esta manera, se trató el derivado BODIPY **273** con 1.2 equiv. de trifenilfosfina, y 1.2 equiv. de azodicarboxilato de dietilo (DEAD) en THF. A continuación y tras 15 minutos de reacción se añadió difenilfosforilazida (DPPA) (1.5 equiv.) y la reacción se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante 24 h. (Es importante reseñar que es crítico el adicionar la DPPA una vez que toda la PPh_3 ya ha reaccionado

³⁴⁰ a) Mitsunobu, O. *Synthesis*, **1981**, 1–28. b) Hughes, D. L. *Org. React.* **1992**, *42*, 335–656. c) Hughes, D. L. *Org. Prep.* **1996**, *28*, 127–164. d) Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.

³⁴¹ Scott, J. P.; Alam, M.; Bremeyer, N.; Goodyear, A.; Lam, T.; Wilson, R. D.; Zhou, G. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 1116–1123.

³⁴² Lal, B.; Pramanik, B. N.; Manhas, M. S.; Bose, A. K. *Tet. Lett.* **1977**, *23*, 1977–1980.

con el DEAD, pues de lo contrario se genera el iminofosforano de la DPPA y la reacción de Mitsunobu no tiene lugar). Tras aislamiento y purificación cromatográfica se pudo aislar el derivado azido-BODIPY **279** con rendimientos moderados.



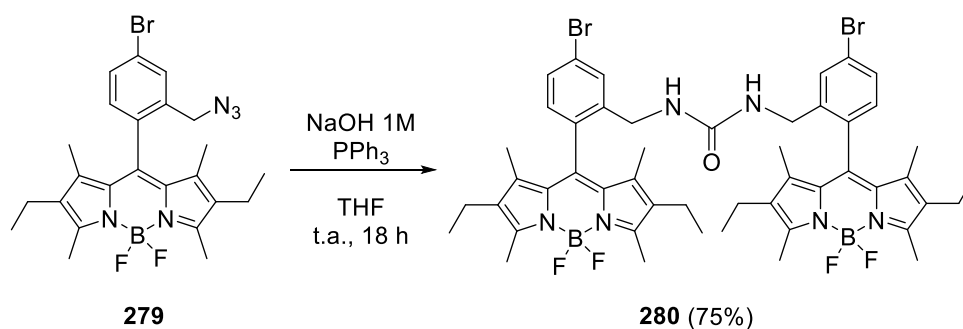
Esquema 87. Síntesis de la azida-BODIPY **279** vía reacción de Mitsunobu.

II.4.4.4 Síntesis y propiedades fotofísicas de bis-BODIPYs simétricos.

Una vez sintetizadas las azidas mencionadas, decidimos estudiar su comportamiento en reacciones de Staudinger/Aza-Wittig.

Inicialmente y para simplificar el proceso, decidimos comenzar ensayando una reacción de Staudinger sencilla que debería generar la correspondiente amina pero que nos permitiría conocer la facilidad con la que se generaba el iminofosforano. Así, se disolvió el BODIPY-azida **279** en THF y a temperatura ambiente fue tratado con PPh₃ y una disolución acuosa de NaOH 1 M (Esquema 88). Pudimos observar entonces la lenta aparición de un nuevo producto de reacción cuya formación fue completa tras 18 h. de reacción. Este producto fue aislado y purificado por cromatografía en columna. La asignación estructural de este nuevo producto, se llevó a cabo en base a la observación de las señales de los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y 2D-HSQC, así como a su espectro de masas. Los datos experimentales obtenidos, sin embargo, no eran coincidentes con los esperados para la amina resultante de la reacción de Staudinger sobre la azida **279**. El espectro de masas obtenido para este nuevo producto presentaba un pico a 1025.28 [M+Na]⁺ mucho más alto del esperado y que indicaba que podía tratarse de un compuesto dimérico. En el espectro de ¹H-RMN se podía observar un desapantallamiento de las señales correspondientes a los protones CH₂ bencílicos, pero la simplicidad de las señales sugería que en caso de tratarse de un dímero, éste debía ser simétrico. Lo más representativo y digno de destacar en el espectro de ¹³C-RMN, era la presencia de las señales atribuibles al núcleo de BODIPY y a las del anillo bencénico, junto con una nueva señal correspondiente a un carbono cuaternario que aparecía a un desplazamiento de 186.5 ppm, y que sugería la presencia de un grupo

carbonilo. La combinación de todos estos datos nos llevó a proponer para el producto aislado la estructura de dímero simétrico **280**, que estaba constituido por dos núcleos del cromóforo BODIPY enlazados por un agrupamiento de tipo urea. Este producto había sido obtenido con un rendimiento superior al 75%.

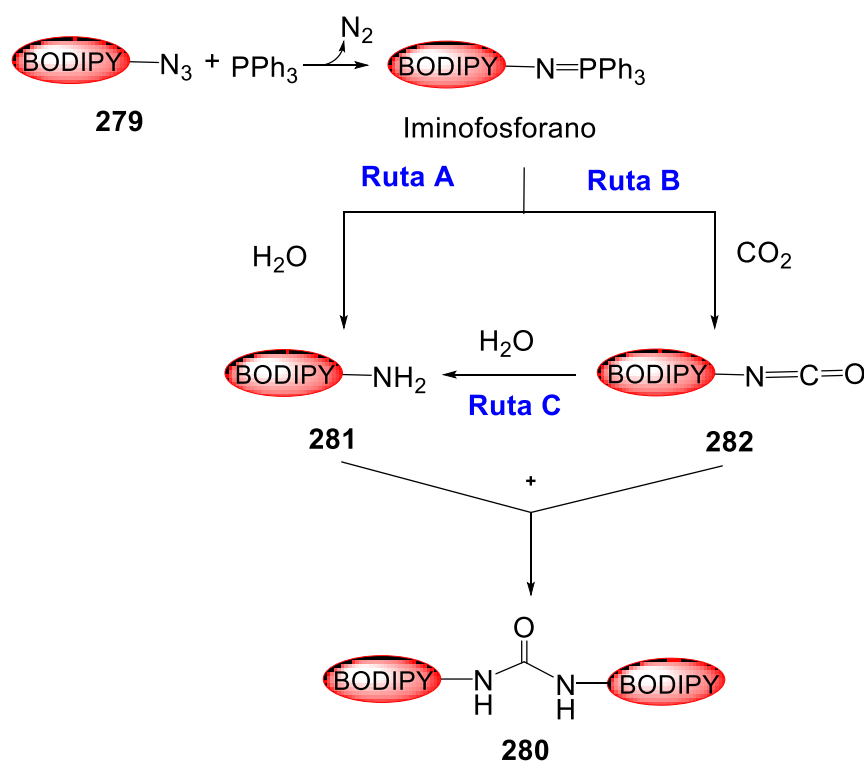


Esquema 88. Síntesis de la urea simétrica **280**.

El curso de reacción que postulamos para la formación de la urea simétrica **280** se muestra en el Esquema 89, e implica la formación inicial de un iminofosforano, por reacción entre el grupo azida del BODIPY (**279**) y trifenilfosfina. En este punto cabe la posibilidad de que el intermedio iminofosforano experimente dos transformaciones de forma simultánea. Por un lado, i) la hidrólisis en presencia del agua presente en el medio de reacción para originar una amina (**281**) y, ii) una transformación de tipo Aza-Wittig por reacción con dióxido de carbono para originar el isocianato **282**. Aunque desconocemos con certeza cual ha podido ser la fuente de CO₂, nos planteamos varias hipótesis: i) que la disolución de NaOH empleada estuviera carbonatada (la solución no había sido preparada inmediatamente antes de su uso), ii) la presencia de CO₂ atmosférico, ya que la reacción no se realizó en atmósfera inerte, o iii) tampoco podemos descartar que el isocianato generado en el medio de reacción evolucione mediante una reacción de hidrólisis³⁴³ y actúe como fuente de amina **281** y CO₂, que a su vez podrían participar en la reacción (Esquema 89). En cualquier caso, sea cual sea el origen de ambos componentes, la reacción entre el isocianato y la amina originaría directamente la urea simétrica observada. Un examen de la literatura nos permitió encontrar un único precedente, del grupo de Azhayev,³⁴⁴ en el que se describe un proceso de carbamoylación análogo al observado por nosotros, al efectuar la reacción de Staudinger de diferentes azidas en presencia de bicarbonato de trialquilamonio y especies nucleófilas del tipo amina o alcohol.

³⁴³ a) Shkapenko, G.; Gmitter, G. T.; Gruber, E. E. *Ind. Eng. Chem.*, **1960**, 52, 605-608. b) Ivanova, E. V.; Muchall, H. M. *J. Phys. Chem. A*, 2007, 111, 10824-10833.

³⁴⁴ Yagodkin, A.; Löschcke, K.; Weisell, J.; Azhayev, A. *Tetrahedron* **2010**, 66, 2210-2221.

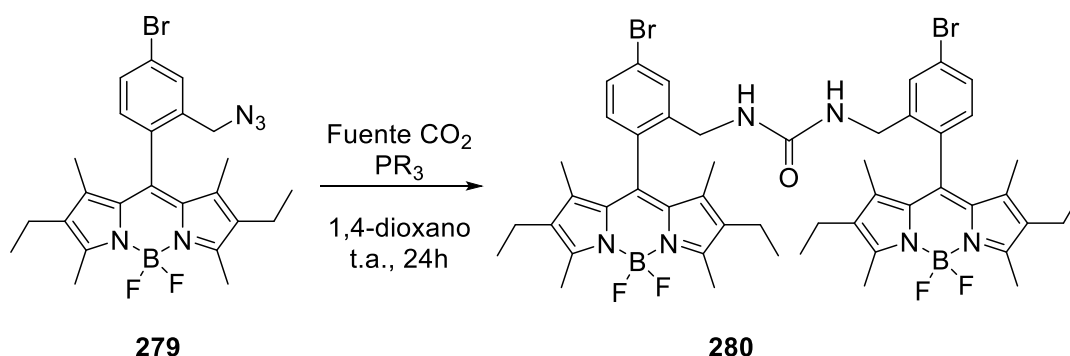


Esquema 89. Mecanismo propuesto para la formación de la urea **280**

i) Síntesis de bis-BODIPY simétricos

A la vista de este inesperado resultado decidimos evaluar la reproducibilidad del proceso, y para ello llevamos a cabo una serie de ensayos dirigidos a determinar las condiciones óptimas de la reacción Staudinger/Aza-Wittig dirigida a la síntesis de ureas simétricas. Las variables a estudiar fueron la fuente de CO₂, la cantidad de la misma, así como la influencia de la naturaleza de la fosfina empleada. De esta manera, se llevaron a cabo una serie de experimentos con diferentes fuentes de CO₂, que incluyeron nieve carbónica, una disolución acuosa 1 M de NaHCO₃ (pH = 8.3), y la solución tamponada de bicarbonato de trietilamonio 1 M (pH = 8.5) que ya había sido descrita en la literatura. Hay que resaltar que todas las fuentes de CO₂ seleccionadas no requieren de equipos especiales y son muy asequibles. Por otra parte, también se evaluó el efecto de reemplazar trifenílfosfina por tributílfosfina.

Como disolvente para estos ensayos se eligió 1,4-dioxano, empleado por el grupo de Azhayev, debido a la solubilidad en él del BODIPY-azida y de PPh₃ de naturaleza muy apolar, y a que era miscible con las disoluciones acuosas empleadas como fuente de CO₂.

Tabla 11. Optimización de condiciones de la reacción de Staudinger-Aza-Wittig.

Entrada	Fuente de CO ₂	Eq. de CO ₂	Fosfina	Rendimiento ^a
1	Nieve carbónica CO ₂ (s)	≈ 1 eq.	PPh ₃	Mezcla productos
2	Nieve carbónica CO ₂ (s)	≈ 5 eq.	PPh ₃	< 10%
3	Disolución NaHCO ₃ 1M	1.2 + 1.2 eq	PPh ₃	No reaccionó
4	Buffer TEAB 1M	1.2 eq	PPh ₃	-
5	Buffer TEAB 1M	2.2 eq	PPh ₃	> 98%
6	Buffer TEAB 1M	2.2 eq	PBu ₃	86 %

^a La reacción se lleva a cabo con 1 equivalente de **279**, y 1.2 equivalentes de fosfina en presencia de CO₂, en dioxano, a temperatura ambiente durante 24 horas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11. Se pudo observar que como fuente de CO₂, el TEAB es el que proporciona los mejores resultados (Tabla 10, comparar entradas 4,5,6 con 1,2,3). Además se comprobó la importancia de la cantidad de disolución tampón de TEAB en el rendimiento de la reacción: mientras que con 1,2 equivalentes de TEAB la reacción es lenta y no se completa tras 24 horas de agitación (Tabla 10, entrada 4), el empleo de 2,2 equivalentes de TEAB conduce a elevados rendimientos de **280** después de 24 horas de reacción en presencia de Bu₃P (Tabla 10, entrada 5), que pasan a ser casi cuantitativos cuando se emplea PPh₃ como fosfina (Tabla 10, entrada 6). Por otra parte se observó que el empleo de nieve carbónica (Tabla 10, entradas 1 y 2) daba lugar mezclas complejas de reacción, probablemente por descomposición de parte del producto de partida. Adicionalmente, el empleo de NaHCO₃ no condujo a la formación de la urea (24 h), recuperándose finalmente el producto de partida inalterado.

De acuerdo con estos experimentos se consideró que las condiciones óptimas para la síntesis de las ureas simétricas implicaban el uso de PPh₃ (1,2 equiv.), TEAB

como fuente de CO₂ (2,2 equiv.), en 1,4 dioxano como disolvente y a temperatura ambiente durante 24 h.

Por otra parte una revisión de la bibliografía nos demostró que existe un interés en aquellas moléculas que enlazan cromóforos, idénticos o diferentes, en estructuras de tipo dimérico. Estas estructuras multicromofóricas, además de servir como modelos sencillos para estudiar fenómenos como la fotosíntesis,³⁴⁵ permiten extender las propiedades optoelectrónicas³⁴⁶ de los colorantes aislados y representan una forma sencilla de incrementar el desplazamiento de Stokes,³⁴⁷ con la consiguiente mejora para su uso en aplicaciones como citometría, microscopía, y concentradores de fotones.³⁴⁸

Por ello, pensamos que sería interesante estudiar la generalidad del proceso de formación de dímeros simétricos a través de la transformación Staudinger/Aza-Wittig de los azido-BODIPYs que habíamos obtenido en la Sección anterior.

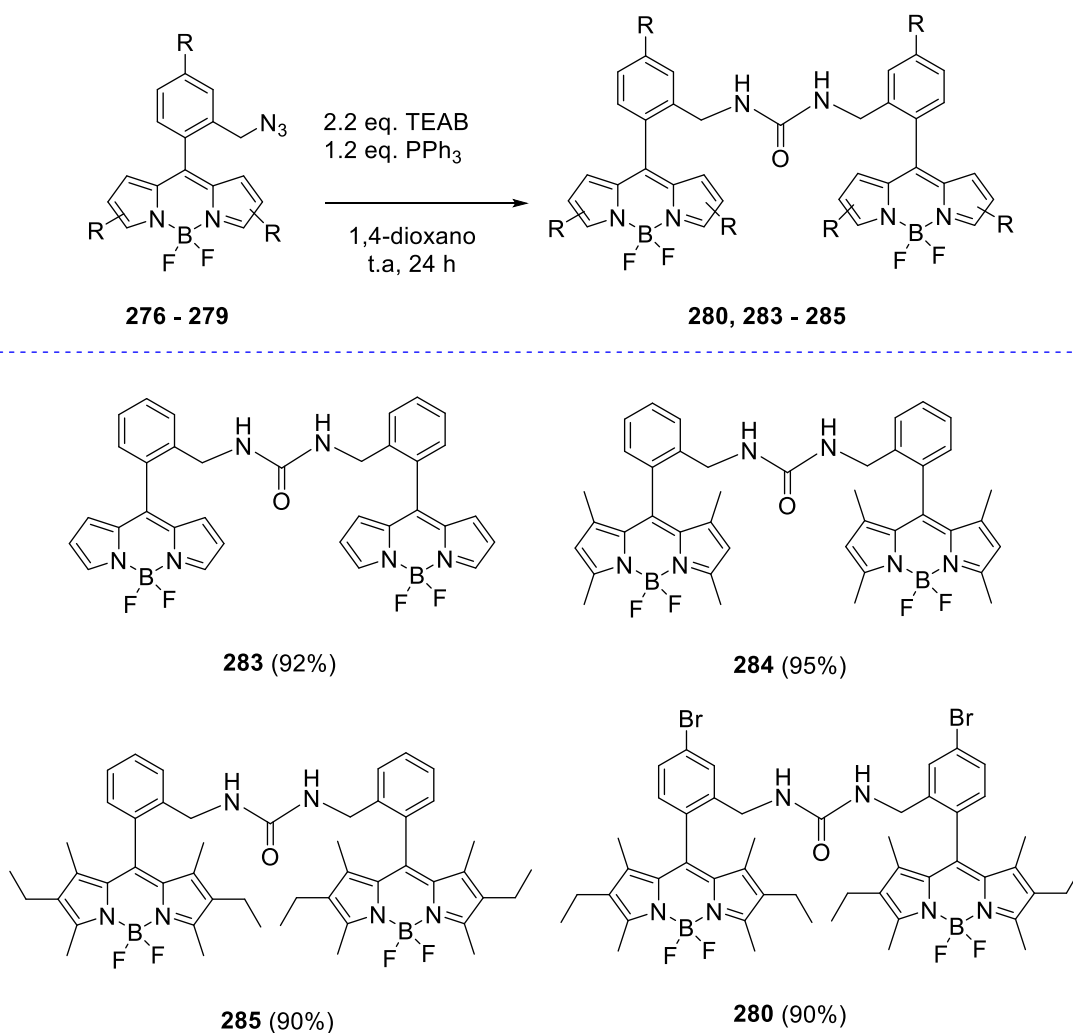
Así, al aplicar el protocolo arriba mencionado a las azidas **276-279** se pudieron obtener las ureas simétricas esperadas, **283**, **284**, **285** y **280** (Esquema 90). La reacción en todos los casos transcurrió con excelentes rendimientos entre el 90-95%.

³⁴⁵ Lockhart, D. J.; Boxer, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**, *85*, 107–111.

³⁴⁶ a) Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 8633–8645. b) Qi, H.; Teesdale, J. J.; Pupillo, R. C.; Rosenthal, J.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 13558–13566; c) Rosenthal, J.; Nepomnyashchii, A. B.; Kozhukh, J.; Bard, A. J.; Lippard, S. J. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 17993–18001. c) Kasha, M. *Radiat. Res.*, **1963**, *20*, 55–70.

³⁴⁷ Benniston, A. C.; Copley, G.; Harriman, A.; Howgego, D.; Harrington, R. W.; Clegg, W. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 2018–2027.

³⁴⁸ Stachelek, P.; Harriman, A. *J. Phys. Chem. A*, **2016**, *120*, 8104–8113.



Esquema 90. Síntesis de los bis-BODIPYs.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la reactividad de nuestros azido-BODIPYs nos han permitido el desarrollo de un método sintético de acceso a bis-BODIPYs simétricos unidos mediante un puente urea. Este método, que transcurre con rendimientos excelentes, previsiblemente implica la generación de especies intermedias como aminometil BODIPYs (p. ej. **281**, Esquema 89) y BODIPY-isocianatos (p. ej. **282**, Esquema 89) a partir de los azido-BODIPYs, así como un proceso posterior de “ureidización” o acoplamiento de ambas especies. Estas tres transformaciones, necesariamente implicadas en la síntesis de los bis-BODIPYs deben ocurrir de forma ordenada y, dado que los rendimientos son mayores del 90%, de manera altamente eficiente. Este protocolo, por tanto, es excelente para la preparación de estructuras biscromofóricas que incorporan dos unidades de BODIPY enlazadas por una agrupación urea de gran estabilidad.

ii) Propiedades fotofísicas de bis-BODIPY simétricos

Sobre los bis-BODIPYs sintetizados se llevaron a cabo los correspondientes estudios fotofísicos. Dichos estudios fueron realizados en la Universidad del País Vasco de Bilbao y el Instituto de Química Física Rocasolano del CSIC en Madrid respectivamente.

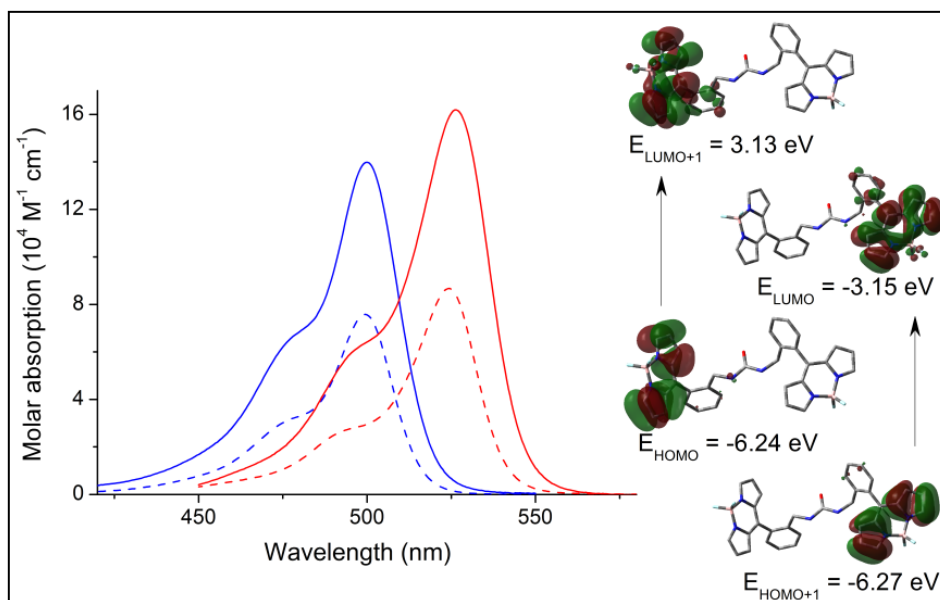
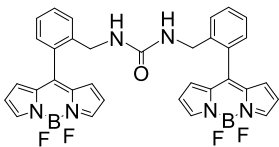
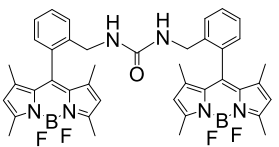
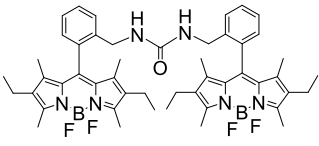
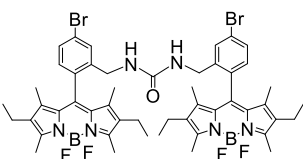


Figura 42. Espectros de absorción de los bis-BODIPYs (línea continua) derivados de **283** (azul) y **285** (rojo) junto con los correspondientes espectros de los BODIPYs aislados (discontinuos). A la derecha se incluyen los orbitales moleculares involucrados en las correspondientes transiciones espectrales.

Las propiedades fotofísicas de los nuevos compuestos fueron analizadas sistemáticamente en disoluciones diluidas (2×10^{-6} M) en disolventes polares (acetonitrilo y etanol) y apolar (ciclohexano). La posición de las bandas espectrales de los BODIPYs coincide con la obtenida para su respectivo colorante simple de referencia (Tabla 12).

Sin embargo los bis-BODIPYs destacan por su alta capacidad de absorción ($\epsilon \approx 130000\text{-}160000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que es prácticamente el doble de la de los colorantes simples. La simulación teórica predice que cada cromóforo contribuye aditivamente a la transición, por tanto la absorción global es la suma de la de cada cromóforo. Es decir, los orbitales ocupados HOMO-1 y HOMO están en BODIPYs diferentes pero muy cercanos en energías (0.03 eV). Lo mismo ocurre con los desocupados LUMO y LUMO+1.

Tabla 12. Propiedades fotofísicas de bis-BODIPYs

BisBODIPY	Disol ^a .	λ_{ab} (nm)	ϵ_{max} ($10^4 M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{fl} (nm)	$\Delta\nu_{st}$ (cm^{-1})	ϕ	τ (ns) (%exp)
 283	ACN	498.5	11.5	512.0	545	0.04	0.14 (79) 0.93 (15) 6.34 (6)
	EtOH	500.0	12.0	514.0	317	0.13	5.86 (5) 0.22 (27) 1.48 (68)
	c-hex	504.5	14.0	519.0	554	0.83	5.57
 284	ACN	498.0	14.8	509.0	434	0.16	0.87
	EtOH	500.0	15.7	511.5	450	0.25	0.68 (13) 2.14 (87)
	c-hex	502.5	13.4	515.0	483	0.83	5.66
 285	ACN	522.5	14.2	537.0	517	0.22	0.05 (48) 4.65 (1) 1.47 (51)
	EtOH	524.0	13.0	537.5	479	0.31	0.49 (36) 3.42 (64)
	c-hex	525.5	16.2	540.5	528	0.98	6.76
 280	ACN	525.0	12.5	538.0	460	0.24	1.18 (87) 6.38 (13)
	EtOH	526.5	12.0	539.0	440	0.41	5.39 (35) 0.48 (28) 3.03 (37)
	c-hex	526.5	15.5	542.0	489	0.91	6.79 (88)
							3.24 (5) 0.19 (7)

^a ACN: acetonitrilo, EtOH: etanol; c-hex: ciclohexano

De hecho, la geometría optimizada de los bisBODIPYs muestra que los cromóforos se alejan entre sí (10-20 Å) (Figura 43). Esta disposición geométrica evita interacciones entre las nubes electrónicas de los cromóforos. Si a esto le unimos que el espaciador no posibilita interacciones resonantes, es normal que cada cromóforo mantenga su identidad molecular tras el anclaje y contribuya aditivamente a la absorción de luz.

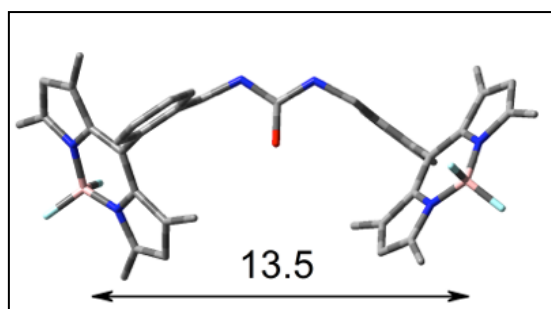


Figura 43. Geometría optimizada del estado fundamental, recalcando la distancia intercromofórica calculada (en Å), del bis-BODIPY **284**.

En relación con los espectros de emisión, se aprecia que la elevada eficiencia de fluorescencia característica de los cromóforos de tipo BODIPY se mantiene en la estructura dimérica pero sólo en disolventes apolares como el ciclohexano lo que está de acuerdo con la idea de que cada una de las unidades de la diada se encuentra electrónicamente aislada en ese medio. Sin embargo, el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) en etanol mostró ser más bajo de lo esperado ($\phi < 0.40$), en comparación con sus respectivos BODIPYs simples de referencia ($\phi > 0.70$). Además las curvas de desactivación pasaban a ser biexponenciales donde el tiempo de vida principal era más corto (< 3 ns). Es por ello que se registraron las propiedades fotofísicas en otro medio polar como el acetonitrilo.

En el disolvente apolar se constata un significativo aumento de la capacidad fluorescente (llegando hasta $\phi = 0.90$) y un alargamiento del tiempo de vida (el ajuste de los curvas pasaba a ser monoexponencial en algunos casos). Por el contrario un aumento de la polaridad del medio, provoca una significativa disminución de la capacidad fluorescente ($\phi < 0.1$ en algunos casos), acompañada de tiempos de vida mucho más cortos (hasta < 1 ns con ajustes triexponenciales).

Es decir, en los bis-BODIPYs la capacidad fluorescente depende fuertemente de la polaridad del medio. Así se obtienen colorantes muy fluorescentes en medios apolares, pero a medida que se aumenta la polaridad del medio la respuesta fluorescente disminuye.

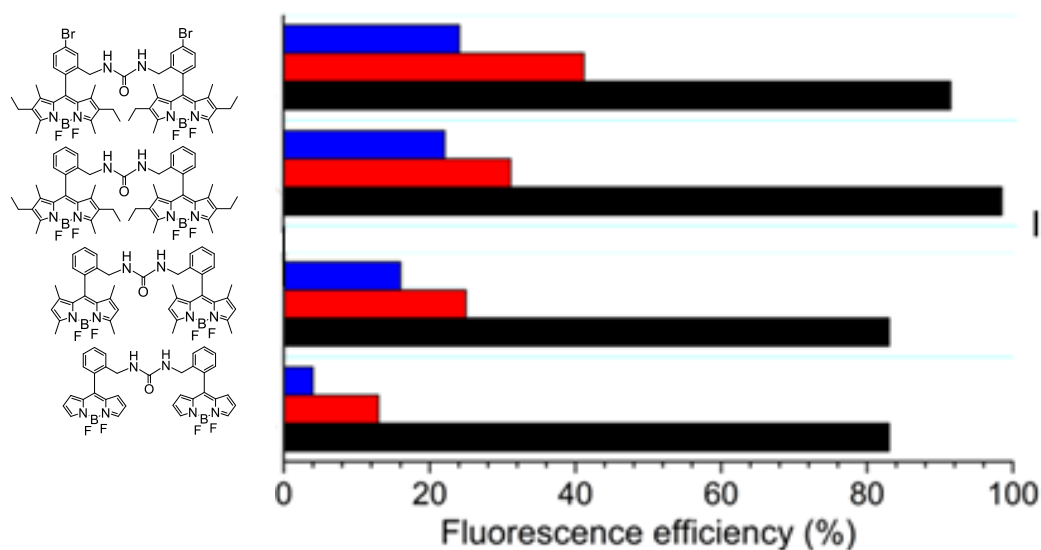


Figura 44. Dependencia del rendimiento cuántico de fluorescencia sobre la polaridad del disolvente (ciclohexano - barras negras, etanol - barras rojas y acetonitrilo - barras azules) para los diferentes bisBODIPYs sintetizados.

Esta sensibilidad con la polaridad del disolvente indica la existencia de un proceso de desactivación no-radiante, concretamente de un proceso de transferencia de carga (ICT).

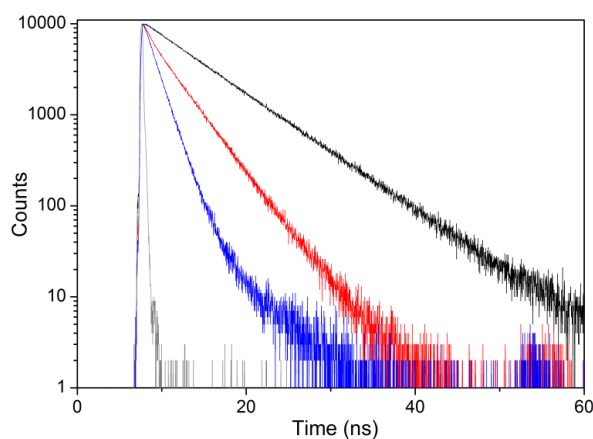


Figura 45 Curvas de decaimiento de fluorescencia de bisBODIPY 285 en disolventes de distinta polaridad (de ciclohexano apolar – en negro, a etanol – en rojo y en acetonitrilo polar - azul).

Los estados ICT implican separación de cargas y por ello destacan por su alto momento dipolar. Como consecuencia se estabilizan fuertemente al aumentar la polaridad del medio. Atendiendo a la estructura molecular, dicho proceso ICT tendrá lugar desde el grupo urea del espaciador (los aminos son buenos dadores de electrones) hacia el BODIPY que actúa como aceptor de electrones. Este estado ICT no es emisor, puesto

que no se observan nuevas bandas de fluorescencia, y se forma tras la excitación, compitiendo con la emisión radiante y desactivándola especialmente en medios polares.

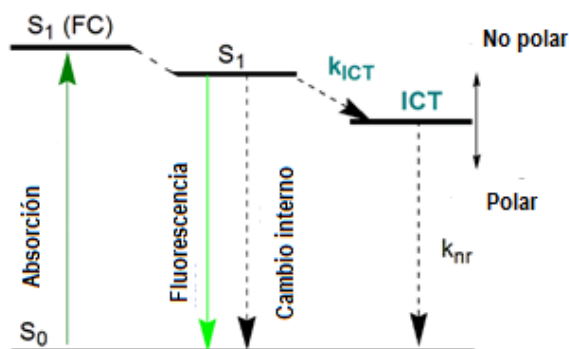


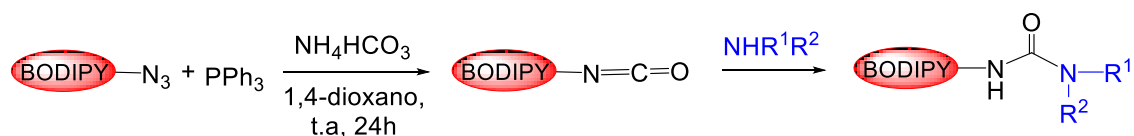
Figura 46.

La atribución de la bajada de la señal fluorescente a procesos ICT intramoleculares no sólo se basa en la dependencia con la polaridad del medio, sino también a la evolución del rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluorescencia con la estructura molecular del bis-BODIPY simétrico, para un disolvente común (ver Tabla 12):

- El compuesto **283**, sin sustituyentes metilo, es el derivado que presenta los rendimientos cuánticos de fluorescencia más bajos, especialmente en etanol y acetonitrilo. Por tanto, la influencia del ICT es alta puesto que el BODIPY (su sistema π de cianina implica la deslocalización de una carga positiva entre los nitrógenos pirrólicos) es buen aceptor para la urea.
- La presencia de grupos metilo en las posiciones 1, 3, 5 y 7 del cromóforo en el derivado **284**, disminuye el carácter aceptor del BODIPY por su efecto inductivo dador de electrones. Como consecuencia el ICT es menos probable, su efecto desactivador es menos evidente y la eficiencia de la señal fluorescente aumenta.
- La presencia adicional de los grupos etilo sobre las posiciones C2 y C6 en el compuesto **285** y su correspondiente derivado bromado **280**, hace que disminuya la capacidad aceptora del BODIPY y con ello se desfavorece el ICT. De hecho, el bis-BODIPY **285** es el colorante que presenta la mayor capacidad fluorescente de la serie y con el rendimiento cuántico de fluorescencia menos sensible a la polaridad del medio.

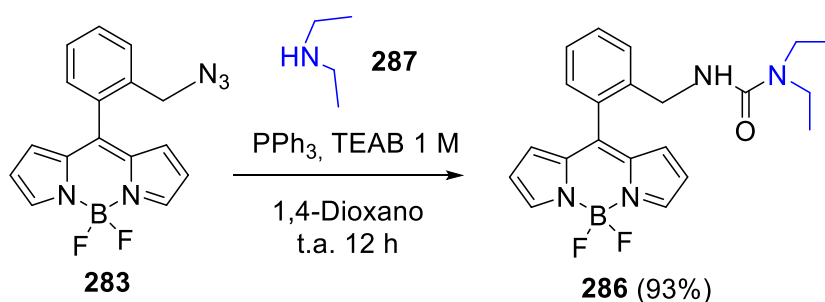
II.4.4.5 Conjugación de azido-BODIPYs con moléculas portadoras de grupos amino

Nuestro objetivo inicial en esta fase de la Memoria consistía en demostrar la utilidad de los azido-BODIPYs como precursores de BODIPY-isocianatos y su utilidad en el marcaje fluorescente de moléculas portadoras de grupos amino. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Sección, podemos postular la existencia de BODIPY-isocianato intermedios (p. ej. **282**, Esquema 89), de alta reactividad, generados en las condiciones de reacción de Staudinger/Aza-Wittig (Esquema 91). En esta línea, nos planteamos que dichos BODIPY-isocianatos generados *in situ* podrían reaccionar con derivados amino externos que estuvieran presentes en el medio de reacción mediante la formación de enlaces urea, y generando por tanto ureas no simétricas (Esquema 91).



Esquema 91. Formación de Ureas asimétricas

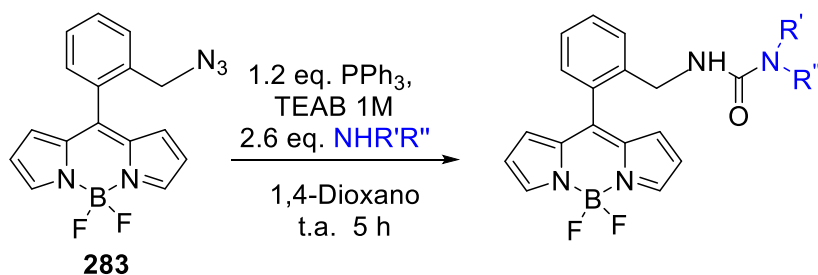
Con esta idea, se disolvió el azido-BODIPY **283** en dioxano y se trató con 1.2 equiv. de PPh_3 , la solución tamponada de TEAB 1 M, y 2.6 equivalentes de dietilamina, tomada como amina modelo. Tras 12 h de reacción se pudo observar la formación de un nuevo producto que, por cromatografía en capa fina, no coincidía con la urea simétrica **283**. Este nuevo producto fue aislado y purificado por cromatografía en columna (Esquema 92), y la observación de sus datos espectroscópicos demostró sin ambigüedad que se trataba de la urea deseada **286**. En los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se apreciaban tanto las señales características del núcleo de BODIPY como del residuo de dietilamina unidos por un agrupamiento urea. El producto pudo ser aislado con un 93 % de rendimiento.



Esquema 92.

A continuación, y una vez comprobado el éxito de la reacción se repitió el proceso en presencia de diferentes aminas, incluyendo algunas aminas primarias (Tabla 13, entradas 1-3), secundarias (Tabla 13, entradas 4, 5), e hidróxido amónico (Tabla 13, entrada 6). En todos estos casos la reacción tuvo lugar en menos de 5 horas obteniéndose las correspondientes ureas **293-298**, con muy buen rendimiento.

Por el contrario, la reacción con glucosamina y citosina no dio lugar a las ureas no simétricas deseadas. Posiblemente debido a que estos compuestos exhiben una pobre nucleofilia en comparación con las aminas empleadas en los ensayos anteriores, así por su baja solubilidad en el medio de reacción. En estos casos, al cabo de 48 h se pudieron recuperar los materiales de partida inalterados, sin detectarse tampoco la formación del bis-BODIPY, que se origina con excelente rendimiento en ausencia de nucleófilo.

Tabla 13. Reacción de formación de ureas a partir de la azida **283** y distintas aminas.

Entrada ^a	Amina	Urea	Rto. (%)
1	<p>288</p>	<p>293</p>	94%
2	<p>289</p>	<p>294</p>	95%
3	<p>290</p>	<p>295</p>	94%
4	<p>291</p>	<p>296</p>	95%
5	<p>$\text{NH}_4^+ \text{OH}^-$</p>	<p>297</p>	88%

II.5 Conclusiones

Se ha desarrollado un nuevo método para la síntesis de derivados de 8-C-aril-BODIPYs con un sustituyente hidroximetilo en posición orto. Este método se puede efectuar como una única operación sintética empleando ftalidas y pirroles como compuestos de partida. El procedimiento es compatible con el empleo de ftalidas de variada naturaleza electrónica y pirroles sustituidos permitiendo el acceso a una amplia colección de BODIPYs.

Los nuevos derivados 8-C-*o*-hidroximetilfenil-BODIPYs son altamente fluorescentes con elevados rendimientos cuánticos ($\phi > 0.7$) respecto a sus correspondientes análogos 8-C-arilo sin sustituyente en *orto*.

La elección de 8-C-aril-BODIPYs con un sustituyente hidroximetilo en posición *orto* también presenta la ventaja de que el grupo hidroximetilo se puede transformar en otras funcionalidades que actúen como puntos de anclaje a otras moléculas. Dentro de las múltiples posibilidades, se ha estudiado su transformación en una funcionalidad azidometilo y se ha evaluado su potencial en reacciones de conjugación.

Se ha evaluado en primer lugar la reacción de cicloadición de alquino azida catalizada por Cu (I) (CuAAC) para la conjugación de cromóforos con derivados de carbohidratos. La fluorescencia y la eficiencia láser de los conjugados obtenidos por esta aproximación, son altas para la mayoría de los carbohidratos que contienen BODIPY, incluso en agua. Por lo tanto, los derivados obtenidos podrían ser candidatos interesantes para visualizar procesos biológicos *in vivo*.

Por otra parte se ha evaluado el comportamiento de estos azidometil BODIPYs en reacciones de tipo Staudinger/aza-Wittig para la generación de isocianatos. Estos intermedios, generados *in situ*, se han empleado para la construcción de dos tipos de compuestos mediante su reacción con moléculas portadoras de una función amina.

Se ha desarrollado un método que permite la dimerización “formal” de azidometil-BODIPYs unidos por un puente de tipo urea. Estos bis-BODIPYs simétricos se obtienen en presencia de bicarbonato de trietilamonio como fuente de CO₂, previsiblemente via acoplamiento de un BODIPY-isocianato con un aminometil-BODIPY, ambos generados como intermedios de reacción a partir del mismo azidometil-BODIPY. Esta reacción, que transcurre a temperatura ambiente, permite obtener ureas simétricas con excelentes rendimientos.

Los bis-BODIPYs sintetizados destacan por una alta capacidad de absorción ($\epsilon \approx 130000\text{-}160000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que es prácticamente el doble de la de los colorantes simples. La simulación teórica predice que cada cromóforo contribuye aditivamente a la transición y la absorción global es la suma de la de cada cromóforo.

Cuando el proceso de “ureidización” se lleva a cabo en presencia de aminas externas, el método permite la generación de ureas no simétricas con elevado rendimiento. La suavidad de las condiciones de reacción debe posibilitar el acoplamiento de azidometil-BODIPYs a biomoléculas portadoras de grupos amino.

III. CAPÍTULO 3.

PARTE EXPERIMENTAL

III.3.1 Consideraciones generales

III.3.1.1 Métodos experimentales

Los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN se registraron con los equipos: Inova-300 (300 MHz), Bruker AM-300 (300 MHz), Varian-Inova 400 (400 MHz) ó Varian Unity 500 (500 MHz) y los espectros de ^{19}F -RMN y ^{31}P -RMN se llevaron a cabo en el Varian-Mercury 400 (400MHz). Los disolventes usados fueron cloroformo deuterado (CDCl_3) y metanol tetradeuterado (CD_3OD). Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón respecto a tetrametilsilano y el valor de las constantes de acoplamiento J en Hertzios (Hz) y tomando como referencia interna la señal residual del disolvente no deuterado. En la descripción de cada producto se indica la multiplicidad de las señales (que viene indicada como s: singlete), d: doblete, t: triplete, c: cuádruplete, q: quintuplete, m: multiplete), la constante de acoplamiento, el número de protones, y su asignación. Las asignaciones de ^1H y ^{13}C se han realizado en base a experimentos bidimensionales de correlación homonuclear COSY (Correlation Spectroscopy) y de correlación heteronuclear HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) y HMBC (heteronuclear multiple-quantum coherence) que se obtuvieron en el Bruker AM-300 (300 MHz) o en el Varian-Inova 400 (400 MHz).

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro LC/MS Hp 1100 mediante la técnica API-ES, en modo positivo, y los espectros de masas de alta resolución (HRMS) en un equipo Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS.

Los poderes rotatorios $[\alpha]_D$ se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 MC a una temperatura entre 21-25 °C en células de cuarzo de 1 dm y empleando luz amarilla de sodio y cloroformo como disolvente. Las concentraciones de las disoluciones (c) se expresan en g/100 mL.

Excepto la reacción Staudinger-Aza-Wittig, todas las demás reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de argón. Los disolventes anhidros empleados se han secado mediante un sistema de purificación de disolventes.

Las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina (CCF), empleando placas de gel de sílice Merck tipo 60 F254 de 0.2 mm de espesor. Se empleó como indicador revelador luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y por carbonización, utilizando como solución reveladora la mezcla ($\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}$ 4:1:20). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo bajo presión y con gel de sílice Merck 230-400

mesh. Los tamices moleculares se secaron en un horno a vacío para laboratorio (B-585 BUCHI), a 200 °C, durante una noche. Las muestras de dadores de glicosidación y nucleobases se presecaron en horno de vacío a 30 °C. La eliminación de los disolventes a presión reducida se llevó a cabo mediante rotavapores Büchi y en el caso de los NPOE la temperatura de baño no excede los 40 °C.

III.3.1.2 Propiedades fotofísicas y experimentos láser

Las propiedades fotofísicas fueron determinadas para soluciones diluidas (alrededor de 2×10^{-6} M), preparadas por la adición del disolvente correspondiente al residuo de la cantidad adecuada de una solución madre del compuesto en acetona, después de la evaporación al vacío de ésta. Los espectros de absorción de UV-Vis y de fluorescencia fueron adquiridos en un espectrofotómetro Varian modelo CARY 4E y en un espectrofluorímetro SPEX Fluorolog. El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ) fue obtenido utilizando una solución diluida de un compuesto de referencia adecuado para cada conjunto de colorantes. Las curvas de decaimiento de la radiación fueron determinadas con la técnica de recuento del fotón único correlacionado al tiempo (Edinburgh Instruments, model FL920), equipado con un detector en placa microcanal (Hamamatsu C4878) con resolución de picosegundos (20 ps). La emisión de fluorescencia fue monitoreada a la longitud de onda máxima después de la excitación, con un láser de diodos (PicoQuant, model LDH410, LDH440 and LDH470) con pulsos de 150 ps FWHM. El tiempo de vida de fluorescencia (η) fue obtenida después de la deconvolución de la señal de respuesta del instrumento a partir de las curvas de decaimiento registradas por medio de un método iterativo. El mejor ajuste exponencial fue controlado por parámetros estadísticos (chi cuadrado, Durbin-Watson y el análisis de residuos). Las constantes de velocidad radiantes (k_{fl}) y no radiantes (k_{nr}) fueron calculadas a partir del rendimiento cuántico de fluorescencia y el tiempo de vida; $k_{fl} = \Phi/\eta$ y $k_{nr} = (1-\Phi)/\eta$.

Experimentos Láser.

Las soluciones líquidas de los colorantes contenidas en celdas de 1 cm de longitud de trayecto óptico, fueron selladas cuidadosamente para evitar la evaporación del disolvente durante los experimentos. Las soluciones de los colorantes fueron bombardeados transversalmente con pulsos a 355 nm (8 ns FWHM and 5 mJ/pulso) a partir del tercer armónico de un láser Q-switched Nd:YAG (Spectron SL282G) a velocidades de repetición de 5 Hz. Los pulsos de excitación fueron enfocados sobre la línea de la celda, proporcionando fluencias sobre el medio activo de 110 mJcm^{-2} . La

cavidad de oscilación (2 cm de longitud) consistió de un 90% de reflectividad de un espejo trasero de aluminio y la cara lateral de la celda como acoplador de salida. Las fotoestabilidades de los colorantes fueron evaluadas por irradiación de una disolución de 10 mL en acetonitrilo o etanol bajo las condiciones láser. Las disoluciones estaban contenidas en tubos Pyrex cilíndrico (1 cm de altura, 1 mm de diámetro interno), los cuales fueron sellados cuidadosamente para evitar la evaporación del disolvente en el transcurso de los experimentos. Aunque la baja calidad óptica de los tubos capilares previene la emisión láser de los colorantes, la información acerca de sus fotoestabilidades puede ser obtenida por el monitoreo del decaimiento en la intensidad de fluorescencia inducida por láser, cuando se excita transversalmente el tubo capilar, como función del número de pulsos de la bomba a una velocidad de repetición de 5 Hz. La emisión de fluorescencia fue monitoreada perpendicular al haz de excitación, colectado por una fibra óptica, reflejado en la ranura de entrada de un monocromador (Acton Research) y detectado con un dispositivo de carga acoplada (CCD) (SpectruMM:GS128B). La emisión de fluorescencia fue registrada por alimentación de la señal t en un boxcar (Stanford Research, model 250) para ser integrada antes de ser digitalizada y procesada por una computadora. Cada experimento fue repetido al menos tres veces. El error estimado en las medidas de fotoestabilidad fue de 10%.

III.3.1.3 Numeración de los compuestos presentados en la memoria

En la determinación estructural de los carbohidratos que aparecen en este capítulo se siguió la numeración habitual en química de carbohidratos, que asigna la posición 1 al carbono anomérico y 2-6 al resto de los carbonos del carbohidrato.

En los 1,2-ortoésteres de pentenilo se numeraron de la forma que se muestra en la Figura 47, asignando la posición 6 al C cuaternario del OE y los carbonos de la cadena alquílica en posición anomérica se asignaron las posiciones con las letras a, b, c, d y e.

Para el caso de los nucleósidos se siguió la numeración IUPAC, donde los átomos de carbono presentes en la ribosa de los nucleósidos se designa con la marca prima (') para distinguirlos de la numeración del esqueleto de las bases, como se indica en la figura 48.

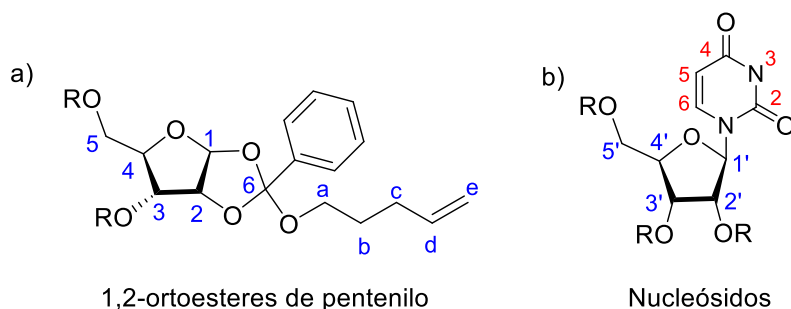
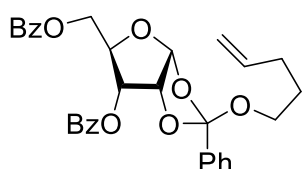


Figura 47. Numeración en a) 1,2-ortoésteres y b) nucleósidos.

III.3.2 Síntesis de Nucleósidos

III.3.2.1 Síntesis de NPOE

3,5-di-O-benzoil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden]- α -D-ribofuranosa (**80**)



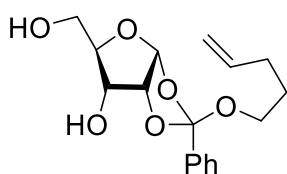
El producto **80** se preparó siguiendo el procedimiento general para la formación de ortoésteres descrito en la bibliografía³⁴⁹.

Sobre una disolución de D-ribosa **75** (1 g, 6.66 mmol) en metanol anhidro (24 mL) a 0 °C, se adiciona gota a gota y con un embudo de adición el cloruro de acetilo (0.42 mL, 5.8 mmol). Se dejó alcanzar lentamente temperatura ambiente, se agitó durante 1 hora (TLC (AcEt/MeOH/n-BuOH/H₂O, 2/1/1/1) y se basificó con piridina (5 mL). Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se coevaporó con cloroformo, obteniéndose 1,1 g de la mezcla de isómeros α/β ribofuranosidos de metilo **76**, que fue utilizada directamente sin posterior purificación. Se disolvió el crudo resultante en piridina (42 mL), se enfrió a 0 °C y se agregó el BzCl (3.3 mL, 28.4 mmol). Se dejó alcanzar la temperatura ambiente, y se mantuvo agitando la reacción durante 48 horas. La mezcla resultante se vertió sobre agua (50 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). Se reunieron los extractos orgánicos, se lavaron sucesivamente con H₂O, con una disolución de H₂SO₄ 3M, con una disolución saturada de NaHCO₃ y con una disolución saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, se evaporó y el sólido resultante se purificó por cromatografía en columna (hexano: acetato de etilo 8:2), obteniéndose 2,6 g del tribenzoato **78** (5.46

³⁴⁹ Changelvala V. S. Ramamurty, Parimala Ganney, C. Srinivas Rao, Bert Fraser-Reid, *J. Org. Chem.*, 2011, 76, 2245–2247.

mmol, 82%). Este compuesto se disolvió en ácido acético (12 mL), se añadió HBr·AcOH (8.6 mL, 45% w/v) y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se diluyó con CH₂Cl₂ (50 mL) y se añadió una mezcla de agua-hielo (200 mL). Se separaron las fases y la fase orgánica se lava con solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 x 25 mL) (se observó abundante desprendimiento de CO₂). Las fases orgánicas combinadas se lavan entonces con una disolución acuosa al 10-15% de CuSO₄ (2 x 25 mL) y con una disolución saturada de NaCl. Se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el bromuro de glicosilo **79** que se usó inmediatamente sin ninguna purificación posterior. Se disolvió este crudo en CH₂Cl₂ (25 mL), se añadió 4-pentenol (0.8 mL, 7.6 mmol) y 2,6-lutidina (0.98 mL, 8.4 mmoles) seguido de Bu₄NI (140 mg, 0.38 mmoles) añadidos en tres porciones en intervalos de 30 minutos. La mezcla resultante se dejó agitando durante 18 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con agua fría (3 x 50 mL), con una disolución acuosa al 10-15% de CuSO₄ (2 x 20 mL) y con una disolución saturada de NaCl. Se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2 conteniendo un 1% de Et₃N), obteniéndose el ortoéster **80** (1.3 g, 2.48 mmol, 65%). Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25} = +125.1^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ 8.02-7.96 (m, 3H), 7.70-7.30 (m, 12H), 6.20 (d, J = 4.1 Hz, 1H, H-1), 5.76 (m, 1H, H_d), 5.25 (dd, J = 5.1, 4.1 Hz, 1H, H-2), 5.03 (m, 1H, H-3), 4.94 (m, 2H, 2H_e), 4.61 (dd, J = 12.3, 3.3 Hz, 1H, H-5a), 4.37 (dd, J = 12.3, 4.7 Hz, 1H, H-5b), 4.18 (m, 1H, H-4), 3.42 (m, 2H, 2H_a), 2.07 (m, 2H, 2H_c), 1.64 (m, 2H, 2H_b). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ 165.5, 165.1, 137.5 (C_d), 137.2, 133.1, 132.7, 129.5 (x2), 129.3 (x2), 129.2 (x2), 128.8, 128.6 (x2), 128.1 (x2), 127.9 (x2), 125.8 (x2), 123.6 (C-6), 114.5 (C_e), 104.2 (C-1), 85.0, 84.3, 77.9, 64.0, 63.6, 30.4, 28.8. **MS** (API-ES modo positivo): 555.3 [M+Na]⁺.

1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden)]- α -D-ribofuranosa (**98**)

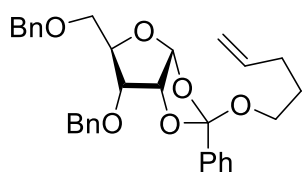


Sobre una disolución de 3,5-di-O-benzoil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden)]- α -D-ribofuranosa **80** (0.5 g, 0.94 mmol) en MeOH (12 mL), se adicionó NEt₃ (6 mL) y se calentó a reflujo (baño de arena a 70 °C) durante una noche.

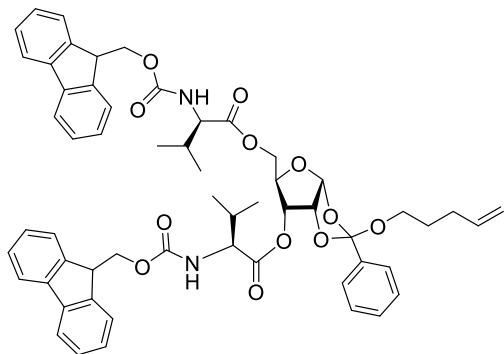
Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a vacío. Para eliminar las trazas de metanol, se añadió cloroformo al matraz y se volvió a eliminar a vacío. Se purificó el producto resultante mediante una pequeña columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 2:8 conteniendo un 1% de NEt₃), obteniéndose 256 mg de diol **98** (0.79 mmol, 85%). Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25} = +31.7^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃). **¹H**

RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.60-7.55 (m, 2H), 7.31-7.29 (m, 3H), 6.07 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H-1), 5.70 (ddt, $J = 16.9, 10.2, 6.6$ Hz, 1H, H_d), 4.90 (m, 2H, H_e), 4.71 (m, 1H, H-2), 3.93 (m, 1H, H-3), 3.74 (dd, $J = 12.5, 3.4$ Hz, 1H, H-5a), 3.53 (dd, $J = 12.5, 3.4$ Hz, 1H, H-5b), 3.43 (m, 1H, H-4), 3.34 (m, 2H, 2H_a), 2.01 (m, 2H, 2H_c), 1.59 (m, 2H, 2H_b). **^{13}C RMN** (75 MHz, CDCl_3): δ 138.4 (C_d), 137.2, 129.9, 128.8 (x2), 126.4 (x2), 124.0 (C-6), 115.4 (C_e), 104.5 (C-1), 81.4, 80.0, 71.3, 63.1, 53.9, 30.7, 29.0. **MS** (API-ES modo positivo): 345.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3,5-di-O-bencil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden)]- α -D-ribofuranosa (**99**)

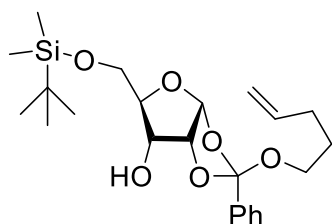


Una disolución de 1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden)]- α -D-ribofuranosa **98** (162 mg, 0.5 mmol) en THF (5 mL), se trató a 0 °C bajo argón con hidruro sódico (dispersión 60% en aceite mineral, 50 mg, 1.50 mmoles) y se agitó la mezcla resultante a esa temperatura durante 20 minutos. A continuación, se añadió bromuro de bencilo (0.18 mL, 1.59 mmoles) y bromuro de tetrabutilamonio (48 mg, 0.14 mmoles). Se agitó la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se volvió a enfriar a 0 °C, se diluyó con éter etílico, se neutralizó por cuidadosa adición de una solución de NH_4Cl , se separaron las dos fases y la fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl . Se secó sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a vacío, y el aceite resultante se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 85/15 conteniendo un 1% de Et_3N), obteniéndose 163 mg de **99** (0.31 mmol, 63%). Aceite incoloro. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +107.4$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **^1H RMN** (300 MHz, CDCl_3) δ 7.73-7.70 (m, 3H), 7.37-7.25 (m, 12H), 6.06 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H-1), 5.80 (tdt, $J = 16.8, 10.1, 6.5$ Hz, 1H, H_d), 5.05-4.95 (m, 2H, 2H_e), 4.84-4.75 (m, 1H, H-2), 4.60-4.44 (m, 4H, 2-OCH₂Ph), 3.94 (dd, $J = 9.1, 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.86 (m, 1H, H-4), 3.70 (dd, $J = 11.4, 1.9$ Hz, 1H, H-5a), 3.52 (dd, $J = 11.3, 3.4$ Hz, 1H, H-5b), 3.41 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 2H_a), 2.10 (m, 2H, 2H_c), 1.68 (m, 2H, 2H_b). **^{13}C RMN** (75 MHz, CDCl_3) δ 138.4, 138.2, 137.9, 137.3, 129.4, 128.8, 128.7 (x 2), 128.6 (x 2), 128.4 (x 2), 128.3 (x 2), 128.0 (x 2), 127.9, 126.6 (x 2), 123.9, 115.2, 104.8 (C-1), 78.6, 78.0, 77.0, 73.7, 72.5, 67.7, 62.8, 30.5, 29.0. **MS** (API-ES modo positivo): 525.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3,5-di-O-fluorenilmetiloxycarbonil-L-valina-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa (100).

Una disolución de 1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa **98** (100 mg, 0.32 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (10 mL) trató con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (123.6 mg, 0.645 mmol), fluorenilmetiloxycarbonil-L-valina (240.4 mg, 0.708 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (3.93 mg, 0.032 mmol). La

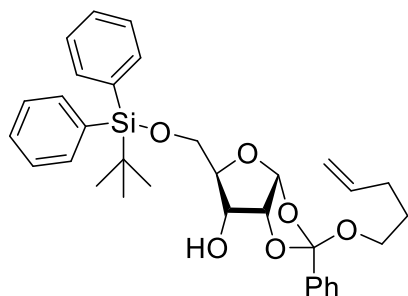
mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL), se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL) y las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na₂SO₄, se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 80:20 conteniendo un 1% de Et₃N), obteniéndose 230 mg de **100** (0.24 mmol, 75%). Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25} = +46.0$ (c = 0.2, CHCl₃). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, J = 7.2 Hz, 2 H), 7.60 (m, 6 H), 7.3 (m, 13 H), 6.1 (d, J = 3.6 Hz, 1 H), 5.75 (m, 1 H), 5.3 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 5.2-4.9 (m, 4 H), 4.75 (dd, J = 5.2 Hz, J = 4.8 Hz, 1 H), 4.10-4.0 (m, 10 H), 3.42 (m, 2 H), 2.1 (m, 4 H), 1.6 (q, J = 7.4 Hz, 2 H), 0.95 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 0.85 (d, J = 7.0 Hz, 6H). **¹³C RMN** (80 MHz, CDCl₃): δ 171.9, 171.3, 144.1, 144.0, 141.6, 138.2, 137.2, 129.6, 128.4, 128.0, 127.3, 126.3, 125.3, 124.3, 120.2, 115.2, 104.4, 77.9, 76.1, 72.9, 67.3, 62.7, 62.6, 59.2, 47.4, 31.5, 30.4, 28.8, 19.2, 17.8.

5-O-terbutildimetilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa (101)

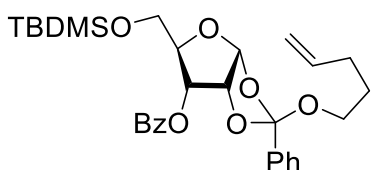
Sobre una disolución de 1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden)]- α -D-ribofuranosa **98** (425 mg, 1.32 mmol) en tetrahydrofurano anhidro (25 mL) bajo argón a 0 °C se añadió imidazol (359 mg, 5.28 mmoles) y una punta de espátula de 4-dimetilaminopiridina. Al cabo de 15 minutos de agitación magnética se añadió cuidadosamente y durante un periodo de 20 minutos tertbutildimetilclorosilano (258 mg, 1.72 mmoles). Se permitió que la mezcla alcanzara lentamente temperatura ambiente y se dejó agitando durante 5 horas. Se diluyó con acetato de etilo (25 mL) y se lavó con una disolución acuosa de NaHCO₃. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo repetidas veces con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución saturada de NaCl (20 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a vacío, y el aceite resultante

se purificó por cromatografía en columna (Hexano/AcOEt 80:20 conteniendo un 1% de Et₃N), obteniéndose 380 mg del producto **101** (0.87 mmol, 66 %). Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25} = +23.0$ ($c = 0.1$, CHCl₃). **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69-7.63 (m, 2H), 7.41-7.36 (m, 3H), 6.05 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1), 5.83-5.72 (m, 1H, Hd), 5.04-4.93 (m, 2H, He), 4.81 (dd, $J = 5.3, 4.1$ Hz, 1H, H-2), 4.01 (dd, $J = 8.7, 5.3$ Hz, 1H, H-3), 3.86 - 3.78 (m, 2H), 3.70 (dd, $J = 11.8, 3.8$ Hz, 1H), 3.51-3.36 (m, 2H, 2Ha), 2.16-2.05 (m, 2H, 2Hc), 1.72-1.61 (m, 2H, 2Hb), 0.88 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 0.04 (s, 3H, Si(CH₃)₃), 0.03 (s, 3H, Si(CH₃)₃). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ 138.1, 137.1, 129.4, 128.4 (x2), 126.2 (x2), 123.5 (C-6), 115.0, 104.3 (C-1), 81.7, 79.7, 71.3, 62.6, 61.5, 30.3 (C_c), 28.7 (C_b), 26.0 (x3), 18.5, -5.2, -5.3. **HRMS** (ESI+) encontrado 437.2352 (M + H)⁺; calculado para [C₂₃H₃₆O₆Si + H + H]⁺ 437.2272.

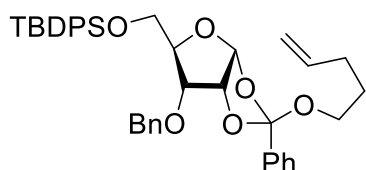
5-O-terbutildifenilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa (**102**)



Sobre una disolución de 1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden)]- α -D-ribofuranosa **98** (117 mg, 0.36 mmol) en THF anhidro (5 mL), a 0 °C bajo atmósfera de argón, se añadió imidazol (97 mg, 1.44 mmoles) y una punta de espátula de 4-dimetilaminopiridina. Al cabo de 15 minutos de agitación magnética se añadió tertbutildifenilclorosilano (120 μ L, 0.47 mmoles). Se permitió que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se diluyó la mezcla de reacción con 20 mL de acetato de etilo y se lavó con una disolución acuosa de NaHCO₃ (10 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo repetidas veces con acetato de etilo (3 \times 10 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución saturada de NaCl (10 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. El producto resultante se purificó por cromatografía en columna (Hexano/AcOEt 80:20 conteniendo un 1% de Et₃N), obteniéndose 127 mg del producto **102** (0.23 mmol, 63 %). Aceite incoloro $[\alpha]_D^{25} = +17.3$ ($c = 0.13$, CHCl₃). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ 7.72-7.63 (m, 6H), 7.44-7.35 (m, 9H), 6.12 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1), 5.92-5.69 (m, H_d), 5.10-4.94 (m, 2H, H_e), 4.89-4.82 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-2), 4.22-4.08 (m, 1H), 3.95-3.71 (m, 2H), 3.58-3.38 (m, 3H), 2.21-2.01 (m, 3H), 1.80-1.59 (m, 2H), 1.2 (s, 9H, C(CH₃)₃). **¹³C RMN** (80 MHz, CDCl₃) δ 138.2, 135.8, 129.9, 129.6, 128.5, 127.9, 126.2, 115.2, 104.5, 81.9, 79.8, 77.9, 71.4, 62.7, 62.2, 30.4, 28.8, 19.5.

3-O-benzoil-5-O-terbutildimetilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa (103).

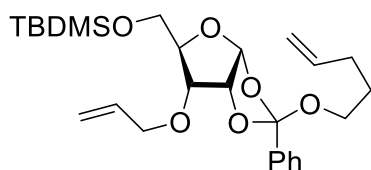
Sobre una disolución de 5-O-terbutildimetilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa **102** (323 mg, 0.74 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (20 mL), a 0 °C y en atmósfera de argón, se añadió Et_3N (410 μL , 2.96 mmoles) y una punta de espátula de 4-dimetilaminopiridina. Al cabo de 15 minutos de agitación magnética se añadió cloruro de benzoilo (84 μL , 0.88 mmoles) y la mezcla resultante se dejó alcanzar lentamente temperatura ambiente. Al cabo de 24 horas se paró la reacción por adición de una solución acuosa saturada de NaHCO_3 . Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (20 mL). Se juntaron las fases orgánicas, se lavaron con H_2O (2 x 20 mL) y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (Hexano/AcOEt 90:10 conteniendo un 1% de Et_3N), obteniéndose 313 mg del producto **103** (0.56 mmol, 96 %). Aceite incoloro $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +18.2$ ($c = 0.14$, CHCl_3), $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.95-7.79 (m, 2H), 7.62-7.44 (m, 3H), 7.44-7.32 (m, 2H), 7.29-7.21 (m, 3H), 6.07 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H-1), 5.67 (ddt, $J = 16.9, 10.2, 6.6$ Hz, 1H, Hd), 5.13 (dd, $J = 5.4, 4.2$ Hz, 1H, H-2), 5.00-4.79 (m, 3H, H_e y H-3), 3.85-3.71 (m, 2H, H-4 y H-5a), 3.61 (dd, $J = 11.8, 3.4$ Hz, 1H, H-5b), 3.34 (m, 2H, 2Ha), 2.08-1.89 (m, 2H, 2Hc), 1.66-1.45 (m, 2H, 2Hb), 0.76 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -0.07 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), -0.08 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). **MS** (API-ES modo positivo): 563.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-O-bencil-5-O-terbutildifenilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa (115).

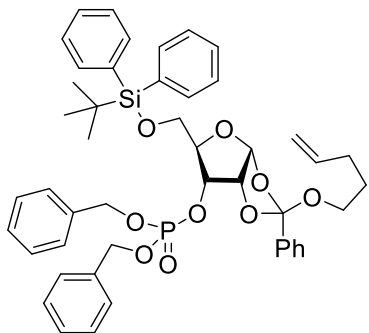
Sobre una disolución de 5-O-terbutildifenilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa **102** (500 mg, 0.91 mmol) en DMF (20 mL), se trató a 0 °C bajo argón con hidruro sódico (dispersión 60% en aceite mineral, 43.8 mg, 1.82 mmol) y se agitó la mezcla resultante a esa temperatura durante 20 minutos. A continuación, se añadió bromuro de bencilo (0.12 mL, 1.00 mmol). Se agitó la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla resultante se vertió sobre agua (30 mL) y se extrajo con eter (3 x 10 mL). Se reunieron los extractos orgánicos, se lavaron con una disolución saturada de NaCl y se secaron sobre Na_2SO_4 . Se eliminó el disolvente a vacío, y el aceite resultante se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 85/15 conteniendo un 1% de Et_3N), obteniéndose 450

mg de **115** (0.67 mmol, 70%). Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25} = +10.3$ ($c = 0.25$, CHCl_3), $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.8-7.6 (m, 7H), 7.4-7.23 (m, 13H), 6.06 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1), 5.9-5.7 (ddt, $J = 6.8$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H, Hd), 5.1-4.92 (m, 2H), 4.88-4.82 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.82-4.76 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.64-4.56 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.16-4.04 (m, 1H), 3.94-3.66 (m, 3H), 3.48-3.36 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.2-2.0 (m, 2H), 1.78-1.69 (m, 2H), 1.0 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

3-O-alil-5-O-terbutildifenilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa (**113**)

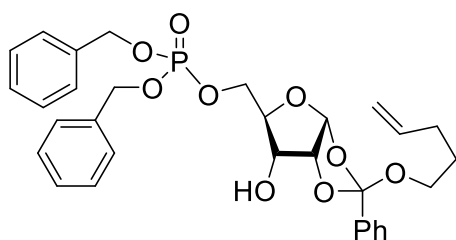


Sobre una disolución de 5-O-terbutildimetilsilil 1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa **102** (200 mg, 0.46 mmol) en THF anhidro (10 mL), a 0 °C y en atmósfera de argón, se añadió hidruro sódico (dispersión 60% en aceite mineral, 28 mg, 0.68 mmol). Se agitó a esta temperatura durante 30 minutos y a continuación se añadió bromuro de alilo (66.18, 0.55 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (46 mg, 0.23 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 12 h, se diluyó con dietiléter (20 mL), se neutralizó por cuidadosa adición de agua (20 mL) y se separaron las dos fases. La fase orgánica se reextrajo con dietiléter (3 x 25 mL). Los combinados orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, y tras filtración se concentró a vacío. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (Hexano/AcOEt 80:20 conteniendo un 1% de Et_3N), obteniéndose 161 mg del producto **113** (0.33 mmol, 70 %). Aceite amarillo. $[\alpha]_D^{25} = +27.94$ ($c = 0.45$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.83-7.60 (m, 2H), 7.48-7.29 (m, 3H), 6.02 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 6.00-5.88 (m, 1H), 5.86 - 5.72 (m, 1H), 5.35 (dq, $J = 17.2, 1.6$ Hz, 1H), 5.23 (dq, $J = 10.4, 1.3$ Hz, 1H), 5.00 (m, 2H), 4.86 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.25 (ddt, $J = 12.7, 5.6, 1.4$ Hz, 1H), 4.11 (ddt, $J = 12.7, 5.9, 1.4$ Hz, 1H), 3.94-3.87 (m, 1H), 3.84 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.74-3.64 (m, 2H), 3.45 (td, $J = 6.5, 1.0$ Hz, 2H), 2.24-2.01 (m, 2H), 1.81-1.61 (m, 2H), 0.91 (d, $J = 0.8$ Hz, 9H), 0.07 (s, 3H), 0.05 (s, 3H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 138.0, 137.3, 134.5, 129.0, 128.1 (x2), 126.3 (x2), 123.6, 117.6, 114.9, 104.3, 79.6, 78.1, 76.6, 71.3, 62.4, 60.6, 30.3, 28.7, 25.9 (x3), 18.4, -5.2, -5.4. **MS** (API-ES modo positivo): 499.28 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-O-bencilfosforil-5-O-terbutildifenilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]-α-D-ribofuranosa (120)

Una solución de cloruro de dibencilfosforilo (194.0 mg, 0.654 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (2 mL) fue añadido lentamente a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ y bajo atmosfera inerte sobre una disolución de 5-O-terbutildifenilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]-α-D-ribofuranosa **102** (120 mg, 0.22 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (133.5 mg, 1.09 mmol) en CH_2Cl_2 seco (10 mL). La mezcla resultante se

dejó que alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo resultante por cromatografía en columna (Hexano/acetato de etilo 40:60 conteniendo un 1% de Et_3N) para obtener 90 mg de **120** (0.11 mmol, 51%). Aceite incoloro. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16.83$ ($c = 0.65$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.6 (m, 6H), 7.40-7.24 (m, 19H), 6.05 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1), 5.7 (m, 1H, Hd), 5.1-4.90 (m, 7H), 4.80 (m, 1H), 3.9-3.6 (m, 3H), 3.4 (dd, $J = 6.6$ Hz, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.1 (m, 2H), 1.7 (m, 2H), 1.05 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P RMN}$ (80 MHz, CDCl_3) δ - 0.77. $^{13}\text{C RMN}$ (80 MHz, CDCl_3) δ 138.2, 137.6, 135.9, 135.8, 133.5, 133.2, 129.9, 129.4, 128.8, 128.4, 128.1, 127.9, 127.9, 126.3, 124.2, 115.1, 104.3 (C-1), 79.6, 79.4, 78.8, 74.1, 69.8, 69.7, 62.6, 61.1, 30.5, 28.8, 26.9, 19.5.

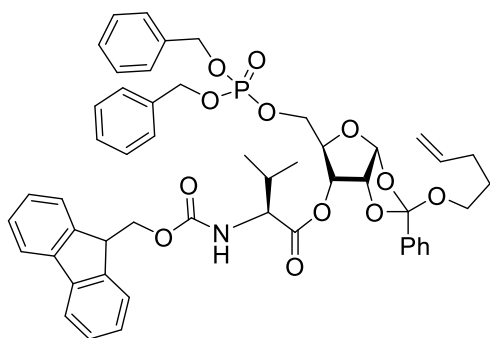
5-O-bencilfosforil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]-α-D-ribofuranosa (119).

Una solución de cloruro de dibencilfosforilo (286.6 mg, 0.97 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (3mL) fue añadido lentamente a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ y bajo atmosfera inerte sobre una disolución de 1,2-O-[1-(4-penteniloxi)benciliden)]-α-D-ribofuranosa **98** (100 mg, 0.32 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (118 mg,

0.97 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 mL). La mezcla resultante se dejó que alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo resultante por cromatografía en columna (Hexano/acetato de etilo 20:80 conteniendo un 1% de Et_3N) para obtener 97 mg de **119** (0.17 mmol, 52 %). Aceite incoloro. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +60.0$ ($c = 0.1$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.7-7.6 (m, 2H), 7.5-7.2 (m, 13H), 5.97 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1), 5.9-5.7 (m, 1H), 5.1-4.9 (m, 6H), 4.78-4.73 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.3-3.85 (m, 3H), 3.6-3.5 (m, 1H), 3.45-3.3 (m, 2H), 2.5 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 2.2-2.0 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.75-1.6 (m, 2H).

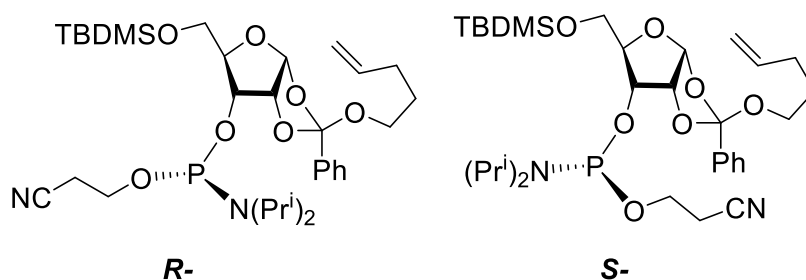
^{31}P RMN (80 MHz, CDCl_3) δ 0.50. ^{13}C RMN (80 MHz, CDCl_3) δ 138.2, 129.6, 129.0, 128.8, 128.6, 128.4, 128.2, 126.3, 126.2, 115.2, 104.2 (C-1), 79.5, 79.4, 71.4, 69.8, 69.7, 69.6, 65.6, 65.5, 62.9, 30.4, 28.8.

5-O-bencilfosforil-3-O-fluorenilmetiloxycarbonil-L-valina-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa (121)



Una disolución de 5-O-bencilfosforil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]- α -D-ribofuranosa **119** (130 mg, 0.228 mmol) en N,N-dimetilformamida seca (10 mL) trató con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (65.6 mg, 0.342 mmol), fluorenilmetiloxycarbonil-L-valina (85.1 mg, 0.250 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (14 mg, 0.114 mmol). La mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL), se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL) y la combinación de fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 , se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 50:50 conteniendo un 1% de Et_3N), obteniéndose **121** (122 mg, 61%). Aceite incoloro. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +60.0$ ($c = 0.1$, CHCl_3). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.60 (m, 3H), 7.4-7.1 (m, 18H), 6.0 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-1), 5.73 (m, 1H, Hd), 5.2-4.85 (m, 8H), 4.73 (dd, $J = 5.4$ Hz, 5.0 Hz, 1H), 4.5-4.13 (m, 5H), 3.98-3.83 (m, 2H), 3.42-3.25 (m, 2H), 2.1 (m, 3H), 1.6 (m, 2H), 1.0-0.78 (dd, $J = 6.6$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 6H). ^{31}P RMN (80 MHz, CDCl_3) δ 0.10. ^{13}C RMN (80 MHz, CDCl_3) δ 171.8, 143.9, 141.6, 138.2, 137.3, 129.5, 128.8, 128.4, 128.2, 128.1, 127.9, 127.3, 126.3, 125.2, 120.2, 115.7, 104.5, 77.6, 72.3, 69.7, 67.3, 64.9, 62.7, 59.1, 47.4, 31.5, 30.4, 28.7, 19.1, 17.7.

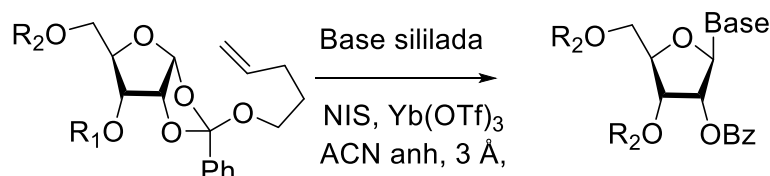
3-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidito)-5-O-terbutildimetilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]-α-D-ribofuranosa (131)



Se disolvió 5-O-terbutildimetilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]-α-D-ribofuranosa **101** (550 mg, 1.26 mmol) en tolueno (5 mL) para eliminar el agua residual, se concentró a presión reducida, y se dejó el matraz a vacío durante una noche. Posteriormente se disolvió bajo argón **101** en CH₂Cl₂ anhidro (5 mL), se enfrió a 0 °C y se añadió N,N-diisopropiletilamina (863 µl, 5.04 mmol). Pasados 10 minutos se añadió gota a gota una disolución de N,N-diisopropilclorofosforamidito de 2-cianoetilo (390 µl, 1.57 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (3 mL). Se dejó que la reacción se calentase hasta alcanzar la temperatura ambiente y se dejó agitando una hora. Después se paró la reacción añadiendo una disolución acuosa 5% NaHCO₃. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Se juntaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolventes a vacío, y el aceite resultante se purificó mediante cromatografía en columna (equilibrada con hexano y 2% NEt₃) por gradiente (acetato de etilo en hexano 5, 10, 15, 20%) para obtener 577 mg (0.90 mmol, 72%) de una mezcla inseparable de diastereoisómeros **131** (45:55). Aceite incoloro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.81 - 7.55 (m, 4H), 7.49 - 7.29 (m, 6H), 6.06 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-1) y 6.01 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-1), 5.78 (ddt, *J* = 17.0, 9.9, 6.5 Hz, 1H, 1 x H_d), 5.77 (ddt, *J* = 17.0, 9.9, 6.5 Hz, 2H, H_d), 5.07 - 4.76 (m, 6H), 4.19 y 4.02 (td, *J* = 9.5, 4.9 Hz, 2H), 3.90 - 3.56 (m, 8H), 3.51 - 3.27 (m, 6H), 3.50 - 3.30 (m, 4H), 2.68 - 2.49 (m, 4H), 2.23 - 2.00 (m, 4H), 1.76 - 1.53 (m, 4H), 1.21 (d, *J* = 6.7 Hz, 12 H, CH(CH₃)₂) y 1.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 12 H, CH(CH₃)₂), 0.87 (s, 9H, C(CH₃)₃) y 0.86 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.04 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.03 (s, 3H, Si(CH₃)) y 0.01 (s, 3H, Si(CH₃)). ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃) δ 8.28, 8.04. ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 138.3, 137.7, 129.2, 128.2, 126.2, 123.6, 117.9, 115.0, 104.6, 80.6, 80.5, 79.5, 71.1, 70.9, 62.5, 60.4, 59.0, 58.7, 43.5, 43.3, 30.4, 28.8, 26.0, 24.8, 24.8, 24.7, 24.7, 20.4, 20.4, 18.5, -5.0, -5.3. HRMS (ESI+) encontrado 637.3409 (M + H)⁺; calculado para [C₃₂H₅₃N₂O₇PSi + H]⁺ 637.3336.

III.3.2.2 Preparación de nucleósidos.

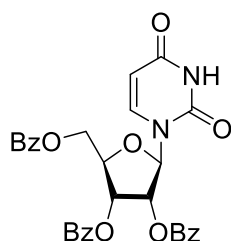
Procedimiento General para la reacción de N-glicosidación



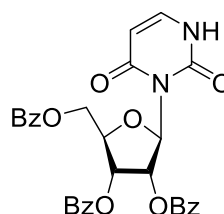
Para asegurar las condiciones anhidras, tanto el ortoéster como la base nitrogenada se disolvieron de forma independiente en tolueno, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se mantuvo a presión reducida durante una noche antes de su utilización.

Se pesan la base nitrogenada (2 mmol) y el agente desecante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.4 mmol) en un matraz de fondo redondeado que había sido presecado a 120 °C. Bajo argón se añade hexametildisilazano (5 mmol) y TMSCl (0.2 mmol) y la suspensión resultante se calienta a 80 °C durante 3-4 h hasta que se observa que se ha solubilizado toda la base. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se eliminaron los volátiles a vacío. Después bajo argón se adiciona una solución del ortoéster (1 mmol) en acetonitrilo seco (1 mL/mmol), y a continuación una solución de NIS (1.3 mmol) y $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (0.2 mmol) en acetonitrilo (1 mL/mmol). Se deja agitando a temperatura ambiente hasta total desaparición del ortoéster de partida (TLC, aproximadamente 3-10 horas). Una vez concluida la reacción, se diluye con CH_2Cl_2 , se lava sucesivamente con una solución saturada de NaHCO_3 que contiene un 10% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, con agua y con salmuera. La fase orgánica se seca sobre NaSO_4 , se filtra y se concentra a vacío. El crudo resultante se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando mezclas de hexano:acetato de etilo como eluyente.

2',3',5'-tri-O-benzoil-β-D-uridina (83) y 2',3',5'-tri-O-benzoil N-3-uridina (84)



83

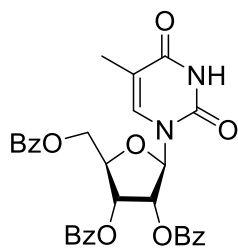


84

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir del uracilo **3** (112 mg, 1 mmol) y el NPOE **80** (265 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 70/30 a 50/50), obteniéndose 255 mg (0.46 mmol, 92%) de una mezcla de isómeros que tras repurificación permitió el aislamiento de ambos regioisómeros puros. **Isómero N-1-uridina 83**, 70%. $[\alpha]_D^{25} = -53.6$ ($c = 1.0$, CHCl_3); $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.41 (bs, 1H, N-H), 8.13 - 8.06 (m, 2H), 7.99- 7.93 (m, 4H), 7.67 - 7.32 (m, 10H), 6.32 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, H-1' β), 5.89 (dd, $J = 6.0$, 4.3 Hz, 1H, H-2'), 5.75 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.61 (d, $J = 8.2$, 1H, H-5), 4.85 (dd, $J = 11.9$, 2.5 Hz, 1H), 4.74 - 4.63 (m, 2H), $^{13}\text{C RMN}$ (80 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 165.6, 165.5, 163.4, 150.5, 139.9, 134.1, 134.0, 133.9, 130.2, 130.1, 129.9, 129.5, 130.0, 128.8, 128.6, 103.7, 88.4, 80.7, 74.0, 71.4, 64.0. **HRMS** (ESI+) encontrado 574.1813 ($M + \text{NH}_4$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9 + \text{NH}_4]^+$ 574.1826. Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía³⁵⁰.

Isómero N-3-uridina, 20%. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.92 (bs, 1H), 8.17 - 8.03 (m, 2H), 8.01 - 7.96 (m, 2H), 7.95 - 7.88 (m, 2H), 7.85 (m, 1H), 7.66 - 7.45 (m, 6H), 7.45 - 7.31 (m, 4H), 6.36 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-1' β), 5.90 (dd, $J = 6.0$, 3.5 Hz, 1H), 5.75 (t, $J = 6.2$, 5.7 Hz, 1H), 4.85 - 4.77 (m, 1H), 4.75 - 4.69 (m, 2H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 165.5, 165.4, 159.6, 149.9, 144.1, 134.0, 134.0, 133.9, 130.1, 130.0, 130.0, 129.2, 129.1, 128.7, 128.7, 128.7, 128.3, 87.7, 81.1, 74.0, 71.5, 69.9, 64.0. **HRMS** (ESI+) encontrado 574.1813 ($M + \text{NH}_4$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9 + \text{NH}_4]^+$ 574.1826.

2',3',5'-tri-O-benzoil- β -D-timidina (**87**)



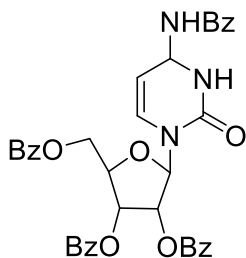
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la timina **4** (126 mg, 1 mmol) y el NPOE **80** (265 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 70/30 a 50/50), obteniéndose 276 mg (0.48, 97%). Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía³⁵¹ **87**: $[\alpha]_D^{25} = -89.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.80 (bs, 1H), 8.18-8.14 (m, 2H), 8.0-7.90 (m, 4H), 7.66-7.32 (m, 10H), 6.43 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-1' β), 5.9 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.75 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.82-4.94 (m, 1H), 4.72-4.60 (m, 2H), 1.57 (s, 3H). $^{13}\text{C RMN}$

³⁵⁰ Nowak, I.; Robins, M. J. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4903–4905

³⁵¹ Zhang, Q.; Sun, J.; Zhu, Y.; Zhang, F.; Yu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 4933–4936.

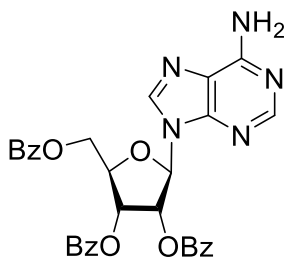
(80 MHz, CDCl₃) δ 166.2, 165.6, 165.6, 164.0, 150.8, 135.2, 134.0, 133.9, 130.2, 130.1, 129.9, 129.5, 129.1, 128.9, 128.8, 128.6, 112.4, 87.3, 80.8, 73.7, 71.7, 64.2, 12.3.

2',3',5'-tri-O-benzoil-β-D-citidina (88)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la N4-benzoilcitosina **85** (217 mg, 1 mmol) y el NPOE **80** (265 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 70/30), obteniéndose 287 mg (0.43 mmol, 82%). Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía^{352,353} **88**: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.78 (bs, 1H), 8.16-8.03 (m, 2H), 8.0-7.82 (m, 7H), 7.66-7.21 (m, 13H), 6.43 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-1'β), 5.9 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.88-5.81 (m, 2H), 4.94-4.68 (m, 3H). ¹³C RMN (80 MHz, CDCl₃) δ 166.3, 165.4, 144.3, 133.8, 133.4, 130.2, 130.0, 129.8, 129.5, 129.2, 128.9, 128.6, 127.8, 98.0, 89.7, 80.9, 74.9, 71.2, 63.8.

2',3',5'-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosil-adenina (94)

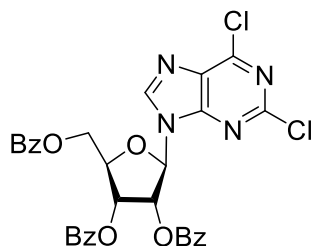


El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la adenina **4** (135 mg, 1 mmol) y el NPOE **80** (265 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (acetato de etilo 100%), obteniéndose 87 mg (0.15 mmol, 30%). Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía³⁵⁴. **94**: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (s, 1H), 8.12-7.84 (m, 7H), 7.62-7.21 (m, 10H), 6.46-6.32 (m, 2H), 6.30-6.22 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.72 (bs, 2H), 4.88-4.62 (m, 3H). ¹³C RMN (80 MHz, CDCl₃) δ 166.4, 165.5, 165.3, 156.0, 153.5, 149.9, 139.3, 133.9, 133.8, 133.6, 130.0, 129.9, 129.6, 129.0, 128.7, 120.3, 87.1, 80.8, 76.6, 74.2, 71.7, 63.9.

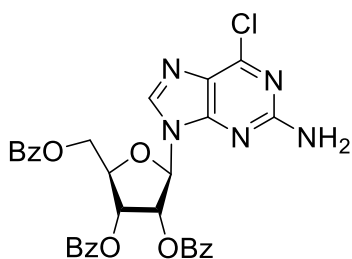
³⁵² Zhang, Q.; Sun, J.; Zhu, Y.; Zhang, F.; Yu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 4933–4936.

³⁵³ a) Rammler, D. H.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 84, 3112–3122. b) Shinomura, N.; Matsutani, T.; Mukaiyama, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1994**, 67, 3100–3106.

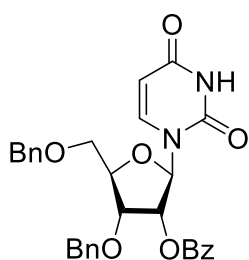
³⁵⁴ Nowak, I.; Conda-Sheridan M.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 7455–7458.

2,6-dicloro-9-(2',3',5'-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil) purina (95)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la 2,6-dicloropurina **90** (187 mg, 1 mmol) y el NPOE **80** (265 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 85/15), obteniéndose 267 mg (0.43 mmol, 85%). Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía³⁵⁵ **95**: $[\alpha]_D^{25} = -57.0$ ($c = 0.3$, CHCl_3). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (m, 1 H), 8.07-7.90 (m, 6 H), 7.64-7.33 (m, 9 H), 6.48 (d, $J = 5.2$ Hz, 1 H), 6.15 (m, 2 H), 4.96-4.70 (m, 3 H). **¹³C RMN** (80 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 165.5, 165.36, 153.5, 152.8, 152.3, 144.5, 134.2, 134.1, 133.8, 131.6, 130.0, 129.8, 129.3, 128.9, 128.8, 128.8, 128.3, 87.4, 81.6, 74.5, 71.8, 63.8. **MS (FABMS)** $M+1 = 633.1$.

2-amino,6-cloro-9-(2',3',5'-tri-O-benzoil-β-D-ribofuranosil)purina (96)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la 2-amino-6-cloropurina **91** (169 mg, 1 mmol) y el NPOE **80** (265 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 80/20), obteniéndose 214 mg (0.35 mmol, 70%). Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía³⁵⁶. **96**: **¹H RMN** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.01-7.80 (m, 6H), 7.52-7.05 (m, 10H), 6.48-6.31 (m, 2H), 6.28 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 5.20 (bs, 2H), 4.91-4.60 (m, 3H). **¹³C RMN** (80 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 165.5, 165.3, 159.4, 153.3, 152.0, 141.3, 134.0, 133.9, 133.6, 130.0, 129.9, 129.8, 129.4, 128.9, 128.7, 128.6, 125.9, 87.5, 80.5, 73.7, 71.5, 63.4.

3',5'-Di-O-bencil-2'-O-benzoil uridina (104)

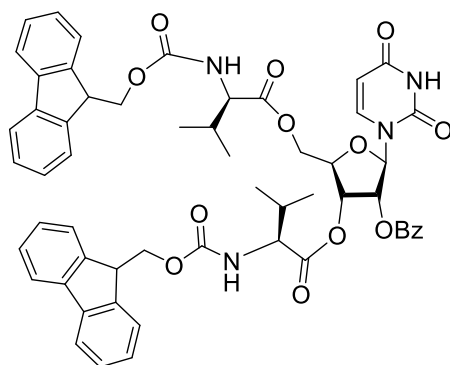
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir del uracilo **3** (112 mg, 1 mmol) y el NPOE **99** (259 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 264 mg (0.45 mmol, 90%). **104**: $[\alpha]_D^{25} = +60.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.61 (bs, 1H), 8.1 (m, 2H), 7.8 (d, $J = 8.0$

³⁵⁵ Hocek, M.; Holy, A.; Dvorakova, H. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2002**, 67, 325–335.

³⁵⁶ Zhang, Q.; Sun, J.; Zhu, Y.; Zhang, F.; Yu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 4933–4936.

Hz, 1H), 7.6 (m, 1H), 7.5-7.2 (m, 12H), 6.3 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 5.5 (dd, $J = 4.2, 4.6$ Hz, 1H), 5.35 (dd, $J = 2.2, 1.8$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 4.5-4.25 (m, 5H), 3.85 (dd, $J = 2.2$ Hz, 1.8 Hz, 1H), 3.6 (dd, $J = 2.2, 1.8$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (80 MHz, CDCl_3) δ 165.7, 164.0, 150.7, 140.5, 137.5, 133.8, 130.3, 129.4, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.3, 128.2, 102.7, 88.12, 82.5, 76.1, 75.3, 73.9, 73.4, 68.9. HRMS (ESI+) encontrado 529,3264 ($M + H$)⁺; calculado para $[\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7 + \text{N}]^+$ 528.1897

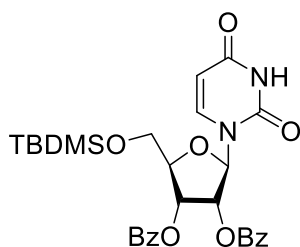
3',5'-Di-O-(Fmoc-Val-O)-2'-O-benzoil uridina (105)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir del uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmol) y el NPOE **100** (241 mg, 0.25 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 6:2), obteniéndose 205 mg (0.21 mmol, 83%). **105**: $[\alpha]_D^{25} = +23.7$ ($c = 0.65$, CHCl_3). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.83 (bs, 1 H), 7.70 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 4 H), 7.6-7.2 (m, 16 H), 5.97 (s, 1 H),

5.83 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 5.60 (bs, 2 H), 5.4 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 5.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 4.6 (d, $J = 11.8$ Hz, 1 H), 4.5-4.0 (m, 10 H), 2.1 (m, 2 H), 1.0-0.6 (m, 12 H). ^{13}C RMN (80 MHz, CDCl_3) δ 172.1, 171.2, 165.6, 162.9, 156.6, 156.2, 150.2, 144.0, 143.9, 141.5, 140.8, 134.0, 130.1, 128.8, 128.5, 127.9, 127.3, 125.3, 125.2, 120.2, 103.8, 89.6, 80.4, 73.72, 71.4, 67.3, 63.8, 59.8, 59.2, 52, 47.4, 47.3, 31.4, 31.2, 29.9, 19.3, 19.1, 18.1, 17.8.

2',3'-O-dibenzoil-5'-O-tertbutildimetilsilil uridina (106)

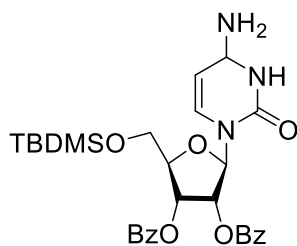


El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir del uracilo **3** (113 mg, 1 mmol) y el NPOE **103** (278 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 7:3), obteniéndose 260 mg (0.46 mmol, 92%). **106**: Sólido blanco. $[\alpha]_D^{25} = -78.13^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ

7.97 (m, 5H), 7.90 (bs, 1H), 7.64 - 7.50 (m, 2H), 7.47 - 7.31 (m, 4H), 6.60 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.78 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 5.72 (dd, $J = 5.5, 1.8$ Hz, 1H), 5.59 (dd, $J = 7.3, 5.5$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.02 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 1.00 (s, 9H), 0.23 (s, 3H), 0.22 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 165.7, 165.3, 163.1, 150.64, 139.7, 133.8, 133.7, 130.0, 129.9, 129.0, 128.6, 128.6, 128.6, 103.5, 85.7, 84.6, 74.4, 72.8, 63.6, 26.0 (x3),

18.5, -5.4, -5.5.). **HRMS (ESI+)** encontrado 567.2134 ($M + H$)⁺; calculado para $[C_{29}H_{34}N_2O_8 + H]^+$ 567.2061.

2',3'-O-dibenzoil-5'-O-tertbutildimetilsilil citidina (**107**)



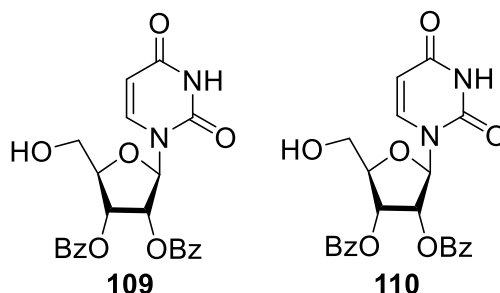
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la citosina **2** (113 mg, 1 mmol) y el NPOE **103** (278 mg, 0.5 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 6:2), obteniéndose 212 mg (0.38 mmol, 75%). **107**: Sólido blanco. **¹H RMN** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.32 (bs, 1H, NH), 8.14 (s, 1H), 7.97 (dt, $J = 8.4, 1.5$ Hz, 4H), 7.58 - 7.46 (m, 2H), 7.42 - 7.29 (m, 5H), 6.74 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.71 (dd, $J = 5.4, 1.8$ Hz, 1H), 5.67 (bs, 2H, NH), 5.48 (dd, $J = 7.5, 5.4$ Hz, 1H), 4.42 (q, $J = 1.9$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H), 1.02 (s, 9H), 0.26 (d, $J = 2.4$ Hz, 6H). **¹³C RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.8, 165.4, 163.7, 154.8, 146.5, 133.7, 133.6, 130.2 (x2), 129.9 (x2), 129.1, 128.8, 128.6 (x2), 128.5 (x2), 85.9, 84.4, 75.1, 72.8, 63.5, 26.4 (x3, CH_3), 18.7, -5.1 (x2, CH_3). **HRMS (ESI+)** encontrado 568.2313 ($M + H$)⁺; calculado para $[C_{29}H_{37}N_3O_7 + H]^+$ 568.2244.

1,5-anhidro-2-O-Benzoil- β -D-ribofuranosa (**108**)



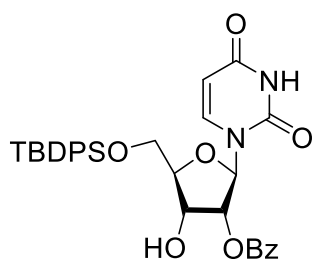
Este producto se obtuvo al tratar el diol-ortoéster de pentenilo **98** (85 mg, 0.25 mmoles), con el uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmoles) con las condiciones descritas en el procedimiento general. Se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 1:9), obteniéndose 42 mg (0.17 mmol, 67%). **108**: $[\alpha]_D^{25} = -27.9^\circ$ ($c = 1.4$, $CHCl_3$). **¹H RMN** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09-8.04 (m, 2H), 7.63-7.44 (m, 3H), 5.35 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-2), 5.13 (s, 1H, H-1), 4.95 (m, 1H, H-4), 4.02 (m, 2H, H-5a, H-3), 3.83 (m, 1H, H-5b), 2.16 (d, 1H, OH). **¹³C RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.2, 133.6, 129.8 (x2), 129.3, 128.5 (x2), 104.5, 82.7, 77.2, 69.7, 66.6. **MS (API-ES modo positivo)**: 473.3 $[2M+H]^+$, 495.3 $[2M+Na]^+$.

2'-O-benzoil-5'-O-tertbutildimetilsilil uridina (109) y 3'-O-benzoil-5'-O-tertbutildimetilsilil uridina (110)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmol) y el NPOE **101** (109 mg, 0.25 mmol). Tras purificación cromatográfica (hexano/acetato de etilo 6:2), se obtuvieron dos fracciones, la primera de ellas contenía el nucleósido **109** puro (69 mg, 0.15 mmol, 60%) mientras que en la segunda (24 mg, 0.05 mmol, 20%) aparecía mezclado junto con otro producto que fue asignado como su isómero **110**. **Isómero 109**. Sólido blanco. $[\alpha]_D^{25} = +18.67$ ($c = 0.12$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (bs, 1H, NH), 8.06 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.68 - 7.53 (m, 1H), 7.51 - 7.35 (m, 2H), 6.40 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.72 (dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz, 1H), 5.26 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.53 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H), 4.12 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 3.98 (dd, $J = 11.7, 2.2$ Hz, 1H), 3.78 (dd, $J = 11.5, 1.9$ Hz, 1H), 1.61 (bs, 1H), 1.00 - 0.80 (m, 9H), 0.04 (s, 6H). **MS** (API-ES modo positivo): 463.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **Isómero 110**. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) (señales escogidas de la mezcla **109** + **110**) δ 9.16 (s, 1H), 8.21 - 8.11 (m, 2H), 7.69 - 7.51 (m, 1H), 7.47 (td, $J = 7.9, 3.0$ Hz, 3H), 6.22 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.75 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.38 (q, $J = 4.6, 3.4$ Hz, 1H), 4.46 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.42 - 4.39 (m, 1H), 4.08 - 3.90 (m, 2H), 1.65 (bs, 1H), 1.04 (s, 9H), 0.22 - 0.04 (m, 6H). **MS** (API-ES modo positivo): 463.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

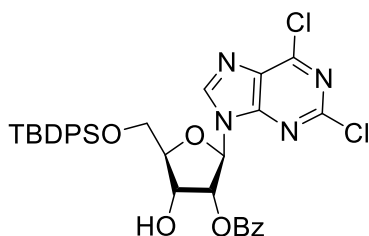
2'-O-benzoil-5'-O-tertbutildifenilsilil uridina (111)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmol) y el NPOE **102** (140 mg, 0.25 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 6:2), obteniéndose 88 mg (0.15 mmol, 61%). **111**: $[\alpha]_D^{25} = +14.5$ ($c = 0.16$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.04 - 8.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.8 - 7.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.3 - 7.7 (m, 13H), 6.36 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 5.4 - 5.49 (m, 2H), 4.68 (m, 1H), 4.1 - 4.2 (m, 2H), 3.8 - 3.9 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.6 (bs, 1H), 1.1 (s, 9H). ^{13}C

RMN (80 MHz, CDCl_3): δ 166.0, 162.8, 150.2, 139.9, 135.9, 135.6, 134.0, 133.0, 132.3, 130.5, 130.4, 130.2, 128.9, 128.8, 128.3, 103.0, 86.7, 85.0, 76.9, 70.0, 63.4, 27.2, 19.6 (x3).

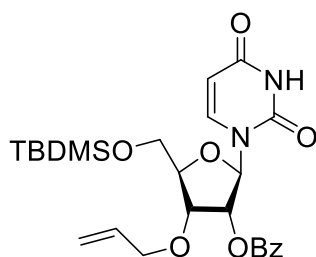
2-O-benzoil-5-O-tertbutildifenilsilil- β -D-ribofuranosil-2,6-dicloropurina (112)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de 2,6-dicloropurina **90** (93.5 mg, 0.5mmol) y el NPOE **102** (140 mg, 0.25 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9:1), obteniéndose 130 mg (0.2 mmol, 80%). **112**: ^1H

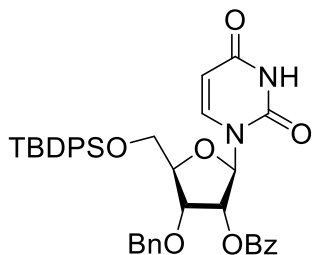
RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.43 (s, 1H), 8.1-8.0 (m, 2H), 7.7-7.3 (m, 13H), 6.44 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.8 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 4.9 (m, 1H), 4.4-4.3 (m, 1H), 4.16-4.06 (dd, J = 2.4 Hz, J = 9.0 Hz, 1H), 3.96-3.86 (dd, J = 2.4 Hz, J = 10.0 Hz, 1 H), 2.3 (bs, 1H), 1.1 (s, 9H).

3'-O-alil-2'-O-benzoil-5'-O-tertbutildifenilsilil uridina (114)

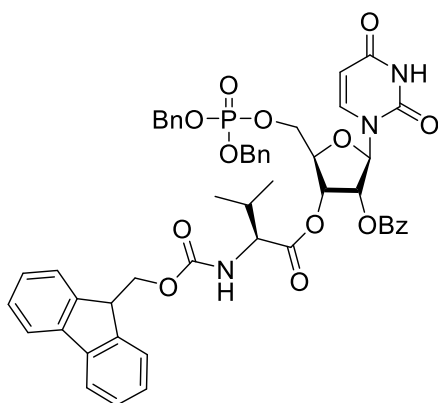


El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmol) y el NPOE **113** (120 mg, 0.25 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 89 mg (0.18 mmol, 71%). **114**: Sólido blanco.

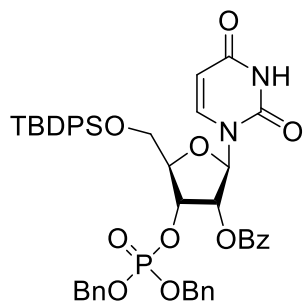
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +32.17$ (c = 0.45, CHCl_3). ^1H **RMN** (300 MHz, CDCl_3) δ 8.12 - 8.04 (m, 2H), 7.97 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.59 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.45 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.30 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 6.01 - 5.87 (m, 1H), 5.87 - 5.73 (m, 1H), 5.71 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.45 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 5.39 - 5.09 (m, 2H), 4.24 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 4.19 - 3.86 (m, 3H), 3.84 - 3.76 (m, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H). ^{13}C **RMN** (101 MHz, CDCl_3) δ 165.7, 162.5, 150.9, 138.2, 131.8, 130.3, 128.3, 128.3, 128.2, 118.3, 102.2, 88.9, 82.3, 75.7, 74.0, 73.5, 68.5, 24.2 (x3), 19.4, -4.8 (x2). **MS** (API-ES modo positivo): 502.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3'-O-bencil-2'-O-benzoil-5'-O-tertbutildifenilsilil uridina (116)

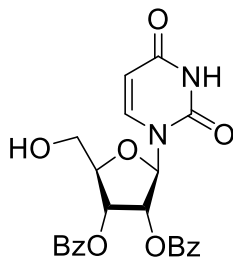
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmol) y el NPOE **102** (162 mg, 0.25 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 6:2), obteniéndose 126 mg (0.19 mmol, 75%). **116**: Sólido blanco. $[\alpha]_D^{25} +27.1$ ($c = 0.5$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.9 (bs, 1H), 8.14-8.04 (m, 2H), 7.8 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.71-7.11 (m, 18H), 6.37 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 5.55 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 5.4 (dd, $J = 2.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.48-4.38 (m, 2H), 4.26-4.02 (m, 2H), 3.8 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H), 1.1 (s, 9H). $^{13}\text{C RMN}$ (80 MHz, CDCl_3) δ 165.7, 163.2, 150.3, 139.9, 137.3, 135.9, 135.6, 133.7, 133.0, 132.4, 130.4, 130.44, 130.36, 129.3, 128.7, 128.6, 128.2, 103.0, 87.4, 83.7, 75.8, 75.2, 73.6, 63.0, 27.3, 19.6 (x3).

5'-O-bis(benciloxi)fosforiloxi-2'-O-benzoil-3'-O-(fluorenilmtoxycarbonol-L-valinoil)uridina. (122)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmol) y el NPOE **121** (225 mg, 0.25 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 4:6), obteniéndose 139 mg (0.15 mmol, 60%). **122**: $[\alpha]_D^{25} = -15.9$ ($c = 0.1$, CHCl_3). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (bs, 1 H), 7.95 (d, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 7.75 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 7.56-7.23 (m, 20 H), 6.24 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.5 (m, 3H), 5.1 (m, 4 H), 4.4-4.0 (m, 8 H), 2.1 (m, 1H), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). $^{31}\text{P RMN}$ (80 MHz, CDCl_3): δ 0.35. $^{13}\text{C RMN}$ (80 MHz, CDCl_3): δ 170.8, 165.1, 162.15, 155.9, 149.9, 143.8, 143.6, 141.2, 139.4, 135.3, 133.8, 129.9, 128.8, 128.7, 126.6, 128.1, 127.7, 127.0, 124.9, 119.9, 103.4, 86.6, 77.4, 77.2, 72.9, 71.5, 69.9, 67.0, 66.3, 58.9, 41.1, 31.0, 29.6, 18.9, 17.4. **HRMS (ESI)**: encontrado 930.2995 ($\text{M} + \text{H}^+$); calculado para $[\text{C}_{50}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{P} + \text{H}]^+$ 930.2925.

2'-O-benzoil-3'-O-bis(benciloxi)fosforiloxi-5'-O-tertbutildifenilsilil uridina (123)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de uracilo **3** (56 mg, 0.5 mmol) y el NPOE **120** (205 mg, 0.25 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 180 mg (0.21 mmol, 85%). **123**: $[\alpha]_D^{25}$ -7.6 ($c = 0.21$, CHCl_3). **^1H RMN (500 MHz, CDCl_3)** δ 8.27 (bs, 1H), 8.03 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.70-7.62 (m, 5H), 7.61 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.48-7.36 (m, 8H), 7.30-7.18 (m, 9H), 7.13-7.09 (m, 2H), 6.48 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.52-5.46 (m, 1H), 5.36 (d, $J = 6.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.26-5.22 (m, 1H), 4.94-4.84 (m, 4H), 4.22 (m, 1H), 3.98-3.76 (dddd, $J = 1.5$ Hz, 12, 10 Hz, 2H), 1.12 (s, 9H). **^{31}P RMN (80 MHz, CDCl_3)** - 0.75. **^{13}C RMN (80 MHz, CDCl_3)** δ 165.4, 162.5, 150.3, 139.6, 135.9, 135.6, 133.9, 132.9, 131.9, 130.5, 130.5, 130.3, 128.9, 128.8, 128.8, 128.4, 128.3, 128.0, 103.4, 85.1, 84.9, 75.6, 74.1, 70.0, 63.9, 27.3, 19.6. **HRMS (ESI)**: encontrado 869.2659 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{46}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{PSi} + \text{Na}]^+$ 869.2738.

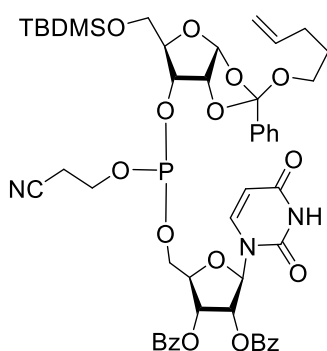
2',3'-O-dibenzoil uridina (130)

Sobre una disolución de 2',3'-O-dibenzoil-5'-O-tertbutildimetilsilil uridina **106** (1 g, 1.76 mmol) en THF anhidro (25 mL), se añadió a 0 °C bajo argón HF.piridina (2 mL, 78 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida (TLC, 3 horas). A continuación se neutralizó a 0 °C mediante la adición cuidadosa de una disolución saturada de NaHCO_3 . Se dejó agitando durante 30 minutos hasta que no se observa evolución de CO_2 . A continuación se diluyó la mezcla de reacción con 25 mL de acetato de etilo y se añadió agua (25 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo 4 veces con acetato de etilo (25 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 mL) y con una disolución saturada de NaHCO_3 , se secaron sobre NaSO_4 . Se eliminó el disolvente a vacío y el líquido resultante se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo en gradiente desde 1/1 a 2/8), obteniéndose 630 mg de **130** (1.27 mmol, 72%). **106**: Sólido blanco. $[\alpha]_D^{25} = -67.6$ ($c = 1.0$, CHCl_3). **^1H RMN (400 MHz, CD_3OD)** δ 8.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 8.3$, 1.4 Hz, 2H), 7.76 (dd, $J = 8.4$, 1.4 Hz, 2H), 7.52 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.39 - 7.30 (m, 2H), 7.24 (dd, $J = 8.3$, 7.4 Hz, 2H), 6.28 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 5.79 - 5.56 (m, 3H), 4.38 (q, $J = 2.8$ Hz, 1H), 3.85 - 3.77 (m, 2H). **^{13}C RMN (101 MHz, MeOD)** δ 166.8, 166.5, 165.9, 152.4,

142.5, 134.8, 130.7, 130.5, 130.0, 129.7, 129.6, 103.5, 88.6, 85.2, 75.5, 73.5, 62.5.
HRMS (ESI): encontrado 453.1315 ($M + H$)⁺; calculado para $[C_{23}H_{20}N_2O_8 + H]^+$ 453.1242.

III.3.2.3 Preparación de dímeros

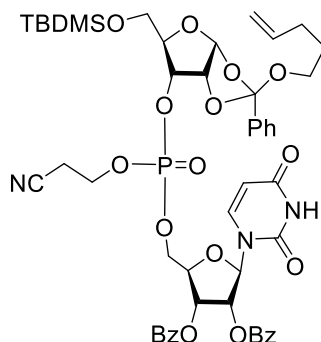
5'-O-terbutildimetilsilil-1',2'-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]-α-D-ribofuranosil-3'-(2-cianoetil)fosfito- 5'-2',3'-O-dibenzoil uridina (131)



Se disolvió la 2',3'-O-dibenzoil uridina **130** (53 mg, 0.12 mmol), la 3-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidito)-5-O-terbutildimetilsilil-1,2-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden)]-α-D-ribofuranosa **131** (86 mg, 0.12 mmol) y el agente de acoplamiento (1,5 eq.) en acetonitrilo anhidro (25 mL) bajo atmósfera de argón en presencia de tamices moleculares 3 Å (≈ 25 mg). Se dejó agitando a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida (TLC, hexano/acetato de etilo 6:4). A continuación se filtraron los tamices moleculares y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en una pequeña columna de gel de sílice. El mejor rendimiento se obtuvo al emplear BIT (50 mg, 0.18 mmol) y tras cromatografía en columna empleando como eluyente (hexano/acetato de etilo 8/2 que contenía un 1% de NEt₃) se obtuvo el dímero **131** (97 mg, 0.1 mmol, 81%) como una mezcla inseparable de diastereoisómeros

131: Mezcla de diastereoisómeros (1:1). Aceite amarillo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.01 - 7.87 (m, 10H), 7.68 - 7.51 (m, 10H), 7.46 - 7.29 (m, 12H), 6.48 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.04 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.86 - 5.68 (m, 5H), 5.59 (td, *J* = 6.3, 3.1 Hz, 2H), 5.03 - 4.85 (m, 6H), 4.63 - 4.43 (m, 6H), 4.39 - 4.03 (m, 6H), 3.88 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 3.80 - 3.65 (m, 4H), 3.46 - 3.32 (m, 4H), 2.69 (q, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.05 (d, *J* = 4.7 Hz, 4H), 1.55 (m, 4H), 0.87 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.86 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 6H). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 139.9, 139.3. ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 165.4, 139.6, 138.1, 133.9, 130.0, 130.0 (CH), 129.5, 129.4, 128.9, 128.7, 128.7 (CH), 128.4, 128.3, 126.3, 124.0, 115.0, 104.4, 103.8 (CH), 86.3, 62.7 (CH₂), 53.6, 30.3 (CH₂), 29.9, 28.7, 26.0 (CH₃), 20.4, 20.3, 18.5, -5.1, -5.2. **HRMS (ESI):** encontrado 1010.3199 ($M + Na$)⁺; calculado para $[C_{49}H_{58}N_3O_{15}PSi + Na]^+$ 1010.3375.

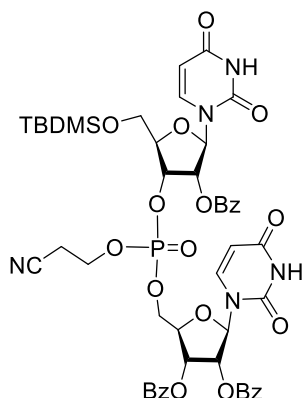
5'-O-terbutildimetilsilil-1',2'-O-[1-(4-penteniloxi)-benciliden]- α -D-ribofuranosa-3'-(2-Cianoetil)fosfato- 5'-2',3'-O-dibenzoil uridina (132)



Sobre una disolución del fosfito **131** (100 mg, 0.1 mmol) en acetonitrilo anhidro (4 mL) a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón y en presencia de tamices moleculares de 3 Å (40 mg), se añadió una disolución de peróxido de 2-butanona (solución 32% en Etalato, 20 μ l, 0.03 mmol) en tolueno (10 μ l). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta desaparición del fosfito (TLC (hexano/acetato de etilo 7/3), 5 minutos). A continuación se diluyó con acetato de etilo (10 mL), se filtró los tamices moleculares y se lavaron tamices con acetato de etilo. El filtrado se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ (10 mL) y con una disolución saturada de NaCl (10 mL). Las fases orgánicas se juntaron, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 6/4), obteniéndose 80 mg (0.08 mmol, 75%).

Mezcla de diastereoisómeros (1:1). Aceite amarillo. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (bs, 2H), 7.93 (m, 8H), 7.63 (m, 4H), 7.55 (m, 6H), 7.43 - 7.28 (m, 14H), 6.36 y 6.34 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.04 (dd, J = 5.1, 4.0 Hz, 2H), 5.87 - 5.67 (m, 6H), 5.59 (td, J = 6.2, 4.3 Hz, 2H), 5.09 (q, J = 4.7 Hz, 2H), 5.04 - 4.86 (m, 4H), 4.74 (ddt, J = 8.6, 6.2, 5.1 Hz, 2H), 4.60 - 4.41 (m, 6H), 4.33 (m, 4H), 3.93 - 3.66 (m, 6H), 3.50 - 3.27 (m, 4H), 2.88 - 2.68 (m, 4H), 2.12 - 1.96 (m, 4H), 1.76 - 1.54 (m, 4H), 0.87 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 6H). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃) δ 165.3, 162.5, 162.5, 150.4, 140.09, 139.9, 138.1, 137.0, 134.0 (4x CH), 130.0, 130.0, 129.6, 129.5, 128.7, 128.5, 128.4, 126.1 (2x CH), 124.2, 116.4, 116.3, 115.1 (2x CH₂), 104.2 (CH), 104.2 (CH), 103.8 (2x CH), 87.5 (2x CH), 81.3 (2x CH), 79.3 (2x CH), 78.5, 74.5 (2x CH), 73.5 (CH), 73.4 (CH), 70.9 (2x CH), 67.2 (2x CH₂), 62.7 (2x CH₂), 60.2 (2x CH₂), 30.3 (2x CH₂), 28.6 (2x CH₂), 26.0 (6x CH₃), 19.7 (2x CH₂), 18.46, -5.1 (2x CH₃), -5.3 (2x CH₃). **³¹P RMN** (162 MHz, CDCl₃) δ -1.33, -1.7. **HRMS (ESI)**: encontrado 1021.3685 (M + NH₄)⁺; calculado para [C₄₉H₅₈N₃O₁₆PSi + NH₄]⁺ 1021.3344.

III.3.2.4 Preparación de dinucleótido (133)



Se pesa el uracilo **3** (14 mg, 0.12 mmol) y el agente desecante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un matraz de fondo redondeado secado a 120 °C, se purgó a vacío y se puso bajo argón. A continuación se añade hexametildisilazano (124 μL , 0.6 mmol) y TMSCl la suspensión resultante se calienta a 80 °C durante 3-4 h hasta que se observa que se ha solubilizado toda la base. Se eliminaron los volátiles a vacío y se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente. Después bajo argón se adiciona una dimero fosfato **132** (40 mg, 0.04 mmol) en acetonitrilo seco (5 mL), y a continuación una solución de NIS (33.7 mg, 0.15 mmol) y $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (24,8 mg, 0.04 mmol). Se deja agitando a temperatura ambiente durante 18 horas, se diluye con CH_2Cl_2 y se concentra a vacío. El crudo resultante se hizo pasar a través de una pequeña columna de gel de sílice (hexano:acetato de etilo 2:8, 1% Et_3N), obteniéndose 9 mg (0.009 mmol, 23%) de una mezcla de diastereoisómeros que no pudo separarse.

Mezcla de diastereoisómeros (1:1). Sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.38 (sb, 1H), 8.03 - 7.87 (m, 6H), 7.84 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.63 - 7.48 (m, 3H), 7.38 (dq, $J = 14.1$, 7.2, 6.6 Hz, 7H), 6.32 (dd, $J = 10.1$, 5.7 Hz, 2H), 5.90 - 5.70 (m, 6H), 4.47 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.08 (d, $J = 12.6$ Hz, 4H), 3.95- 3.84 (m, 2H), 2.77 (s, 2H), 0.96 - 0.78 (m, 9H), 0.07 (s, 6H). $^{31}\text{P RMN}$ (162 MHz, CDCl_3) δ -0.12, -0.38. **MS** (API-ES modo positivo): 1031 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

III.3.3 Síntesis de BODIPYs

III.3.3.1 Desarrollo de métodos eficientes de síntesis de derivados de BODIPYs C-8 aril-sustituídos

Procedimientos generales de síntesis de ortohidroximetilfenil- BODIPYs.

Método A. Por un procedimiento en dos etapas con aislamiento del dipirrometano. Se pesa la lactona correspondiente (1 mmol) y los tamices moleculares de 4 Å previamente activados (200 mg/mmol) y bajo Argon se adiciona CH_2Cl_2 anhidro (1 mL/mmol). A continuación, se adiciona tetrafluoroborato de trietiloxonio (0,9 mmol) disueltos en CH_2Cl_2 anhidro y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se enfría a 0 °C y se adiciona el correspondiente pirrol (10 eq. para el pirrol sin sustituir y 3 eq. para pirroles sustituidos). Se deja alcanzar la

temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agita durante 3 horas. A continuación, se diluye con CH_2Cl_2 , se filtran los tamices, se trata con una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico y la fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Los combinados orgánicos se secan sobre sulfato magnésico anhidro y se concentra a sequedad. El crudo resultante se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente la mezcla de hexano:acetato de etilo indicada en cada caso.

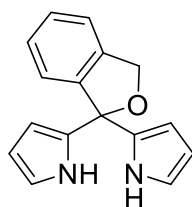
A una disolución del producto anterior en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL/mmol) bajo atmósfera de argón y a 0°C se adiciona Et_3N (1 mmol) y $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (8 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se diluye con CH_2Cl_2 , se adiciona una disolución saturada de bicarbonato sódico en agua y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se concentra a vacío. El residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente la mezcla de hexano:acetato de etilo indicada en cada caso.

Método B. Por un procedimiento “one-pot”. Se pesa la lactona correspondiente (1 mmol) y los tamices moleculares (4 Å, previamente activados) (200 mg/mmol) y bajo Ar se añade CH_2Cl_2 anhidro (1 mL/mmol). A continuación, se adiciona tetrafluoroborato de trietiloxonio (0,9 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se enfría a 0 °C y se adiciona el correspondiente pirrol (10 eq. para el pirrol sin sustituir y 3 eq. para pirroles sustituidos). Se deja alcanzar la temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agita durante 3 horas. A continuación, se enfría a 0 °C y se adiciona Et_3N (1 mmol) y $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (8 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se trata con una disolución saturada de bicarbonato sódico en agua y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro y se concentra a vacío. El residuo se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente la mezcla de hexano:acetato de etilo indicada en cada caso.

En algunos casos, el BODIPY resultante se obtiene contaminado con ftalida de partida sin reaccionar debido a que ambos suelen tener un R_f muy similar en mezclas de acetato de etilo y hexano. En los casos, dónde la separación cromatográfica de la mezcla resulta complicada, se ha comprobado que si agitamos la mezcla de reacción diluida en CH_2Cl_2 en presencia de una solución acuosa de NaOH 1 N durante 90 minutos, facilita la purificación. En estas condiciones, la ftalida sufre una reacción de

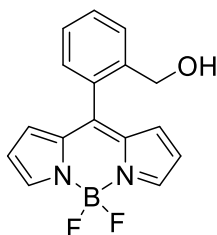
saponificación para originar un carboxilato sódico que es soluble en agua facilitándose así el aislamiento del BODIPY puro.

2,2'-(1,3-dihidroisobenzofuran-1,1-diil)-bis(1H-pirrol) (**203**)



Sobre tamiz molecular de 4 Å previamente activado, se añadieron 737 mg de la ftalida **198** (5.23 mmoles), y 15 mL de CH₂Cl₂ anhidro. A esta disolución, se adicionaron 0.9 equivalentes de tetrafluoroborato de trietiloxonio (Sal de Meerwein) (930 mg, 4.89 mmoles), disueltos en otros 5 mL de CH₂Cl₂. Tras 24 horas de reacción a temperatura ambiente, se enfrió la reacción a 0 °C, y se añadieron 10 equivalentes de pirrol **146** (3.33 mL, 48.94 mmoles), y se agitó la reacción durante una noche a temperatura ambiente. Después de observar por CCF que la reacción había finalizado, se elaboró la reacción, diluyendo con CH₂Cl₂, y lavando con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃. Se separaron las dos fases, y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 85:15), obteniéndose el dipirrometano **203** (748 mg, 69%). **203**: Sólido blanco. p.f.: 71-73 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (bs, 2H, NH (x2)), 7.40-7.19 (m, 4H aromáticos), 6.72 (td, *J* = 2.7, 1.5 Hz, 2H), 6.13 (dt, *J* = 3.5, 2.6 Hz, 2H), 5.93 (ddd, *J* = 3.5, 2.6, 1.6, 2H), 5.11 (s, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 143.0, 139.1, 133.3, 128.3, 127.8 (6 Caromáticos), 123.3, 121.2, 118.4, 108.5 (x2), 107.8 (x2), 85.7 (x2), 71.2. **HRMS (ESI)**: encontrado 251.11764 (M + H)⁺; calculado para [C₁₆H₁₄N₂O + H]⁺, 251.11789

8-(2(hidroximetil)-fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (**204**)³⁵⁷



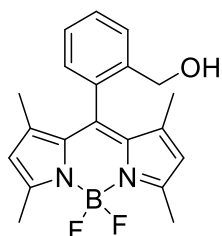
El producto se preparó siguiendo el método A a partir de dipirrometano **203** (500 mg, 2.0 mmol) y pirrol **146** (1.5 g, 20 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9:1), obteniéndose 250 mg (0.82 mmol, 41%).

Alternativamente, el producto se preparó siguiendo el método B a partir de 1-isobenzofuranona **198** (2,8 g, 21.0 mmol) y pirrol **146** (14 g, 210 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9:1), obteniéndose 2.5 g (5.3 mmol, 26%). **204**: Cristales naranjas. p.f. = 101-102 °C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,92 (s, 2H), 7,66 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,54-7,56 (m, 1H), 7,38-7,41 (m, 1H), 7,30-7,31

³⁵⁷ Roacho, R. I.; Metta-Magaña, A. J.; Peña-Cabrera, E.; Pannel, K. H. *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, 26, 345-351.

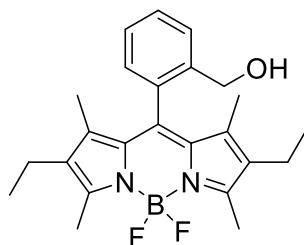
(m, 1H), 6,70 (d, 2H, $J = 4,1$ Hz), 6,48 (d, 2H, $J = 4,1$ Hz); 4,59 (s, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 144,6, 145,5, 139,3, 135,4, 131,3, 131,0, 130,1, 129,8, 128,0, 127,0, 118,7, 62,3. ^{19}F RMN (CDCl_3 , 376 MHz): δ -144,9 (q).

8-(2-(hidroximetil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora3a,4a-diazo-s-indaceno (211)

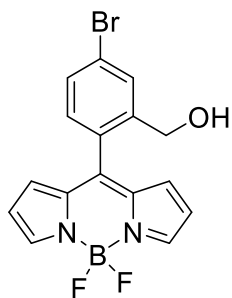


El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 1-isobenzofuranona **202** (1.45 g, 10.8 mmol) y 2,4-dimetilpirrol **134** (3.13 mL, 29.5 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8/2), obteniéndose 1.6 g (4.6 mmol, 43%). **211**: Cristales naranjas. **p.f.** = 90-92 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 7.41 (t, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 2.54 (s, 6H), 1.35 (s, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) 155.9, 143.0, 139.8, 138.2, 132.9, 131.0, 129.7, 128.5, 128.2, 128.1, 121.5, 62.4, 14.7, 14.0. **HRMS** (ESI-QTOF) encontrado 377.1598 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BF}_2\text{N}_2\text{NaO} + \text{Na}^+]$, 377.1613.

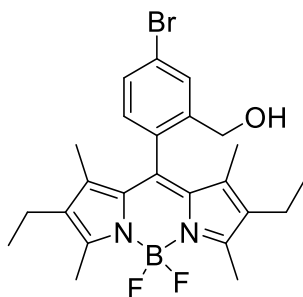
8-(2-(hidroximetil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4,4-difluoro-4-bora3a,4a-diazo-s-indaceno (212)



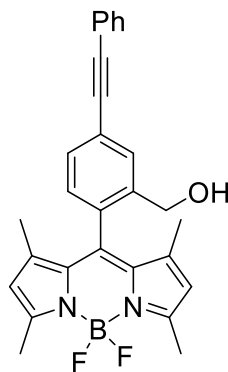
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 1-isobenzofuranona **202** (520 mg, 3,87 mmol) y 3-etil-2,4-dimetilpirrol **208** (1,4 mL, 10,6 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8/2), obteniéndose 576 mg (1.4 mmol, 36%). **212**: Cristales rosa. **p.f.** = 92-94 °C. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,64 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,51 (td, $J = 7,5, 1,4$ Hz, 1H), 7,41 (td, $J = 7,5, 1,2$ Hz, 1H), 7,20 (dd, $J = 7,5, 1,3$ Hz, 1H), 4,59 (dd, $J = 3,4, 1,6$ Hz, 2H), 2,53 (s, 6H) 2,29 (q, $J = 7,5$ Hz, 4H), 1,26 (s, 6H), 0,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 154,3, 138,1, 134,2, 133,9, 133,2, 130,5, 129,6, 129,3, 128,6, 128,5, 128,2, 62,8, 17,3 (x2), 14,8 (x2), 12,8 (x2), 11,4 (x2). ^{19}F RMN (CDCl_3 , 376 MHz) δ -146,06 (q, $J = 32,8$ Hz), -146,24 (d, $J = 33,0$ Hz). **HRMS** (ESI $^+$): encontrado 411.1613 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{BBrF}_2\text{N}_2\text{O} + \text{H}^+]$, 411,2341.

8-(4-(bromo)-2-(hidroximetil)-fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-sindaceno (219)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 5-bromo-3H-isobenzofuranona **213** (372 mg, 1,75 mmol) y pirrol **146** (1,3 mL, 17,5 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9/1), obteniéndose 184 mg (0,48 mmol, 28%). **219**: Sólido amarillo. **p.f.** = 109-110 °C. **¹H RMN** (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,95 (s, 2H), 7,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,56 (dd, *J* = 8,0, 2,0, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,70 (d, *J* = 4,3 Hz, 2H), 6,51 (d, *J* = 4,1 Hz, 2H), 4,59 (s, 2H). **¹³C RMN** (CDCl₃, 125 MHz) δ 145,2, 143,9, 141,4, 135,1, 131,2, 131,0, 130,7, 130,3, 130,0, 124,7, 119,03, 61,9. **¹⁹F RMN** (CDCl₃, 376 MHz) δ -146,19 (q, *J* = 31,9 Hz). **HRMS** (ESI+) encontrado 394,0534 (M + NH₄)⁺; calculado para [C₁₆H₁₂BBBrF₂N₂O+NH₄⁺] 394,0537.

8-(4-(bromo)-2-(hidroximetil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (220)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 5-bromo-3H-isobenzofuranona **213** (472 mg, 2,22 mmol) y 3-etil-2,4-dimetil-pirrol **205** (0,8 mL, 6,05 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8/2), obteniéndose 249 mg (0,51 mmol, 31%). **220**: Sólido rosa. **p.f.** = 111-113 °C. **¹H RMN** (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,85 (dt, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,55 (dd, *J* = 8,1, 2,0 Hz, 2H), 7,08 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,57 (s, 5 2H), 2,52 (s, 6H), 2,29 (q, *J* = 7,6 Hz, 4H), 1,30 (s, 6H), 0,98 (t, *J* = 7,6 Hz, 6H). **¹³C RMN** (CDCl₃, 125 MHz) δ 154,7, 140,9, 138,0, 136,5, 133,4, 132,5, 131,5, 131,0, 130,3, 130,1, 123,8, 62,1, 17,3 (x2), 14,8 (x2), 12,8 (x2), 11,70 (x2). **¹⁹F RMN** (CDCl₃, 376 MHz) δ -146,18 (q, *J* = 31,9 Hz). **HRMS** (ESI+) encontrado 489,1518 (M + H)⁺; calculado para [C₂₄H₂₈BBBrF₂N₂O+H⁺] 488,1446.

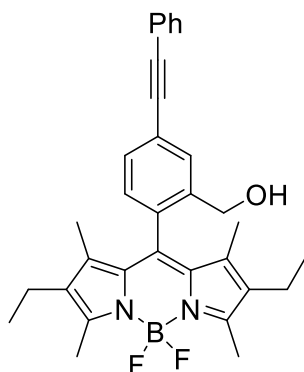
8-(2-(hidroximetil)-4-(feniletinil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (222)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 5-(2-feniletinil-3H-isobenzofuranona **217**³⁵⁸ (800 mg, 3.4 mmol) y 2,4-dimetil-pirrol **134** (1.05 mL, 10.2 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8/2),

obteniéndose 694 mg (1.5 mmol, 45%). **222**: Cristales naranjas.

m.p. > 230 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (dd, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.57 (m, 3H), 7.37 (m, 3H), 7.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 2.56 (s, 6H), 1.42 (s, 6H); **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ 156.2, 142.9, 138.9, 138.7, 132.9, 131.8, 131.4, 131.2,

130.8, 128.8, 128.6, 128.4, 124.9, 123.0, 121.6, 90.9, 88.8, 62.1, 14.8, 14.3. **API-ES** positivo 455.3 (M+H)⁺. **HRMS** (ESI-QTOF) encontrado 455.2115 (M + H)⁺; calculado para [C₂₈H₂₆B F₂N₂O + H]⁺ 455.2106.

8-(2-(hidroximetil)-4-(feniletinil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4,4difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (223)

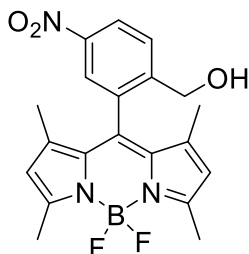
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 5-(2-feniletinil-3H-isobenzofuranona **217**³⁵⁹ (800 mg, 3.4 mmol) y 3-etil-2,4-dimetil-pirrol **205** (1.38 mL, 10.2 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8/2), obteniéndose 590 mg (1.2 mmol, 34%). **223**: Cristales rosas. p.f.= 216-218 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.87 (s, 1H), 7.66 – 7.51 (m, 3H), 7.37 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 7.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.60 (s, 2H),

2.54 (s, 6H), 2.30 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.33 (s, 6H), 0.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 6H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ 156.2, 142.9, 138.9, 138.7, 132.9, 131.8, 131.4, 131.2, 130.8, 128.8, 128.6, 128.4, 124.9, 123.0, 121.6, 90.9, 88.8, 62.1, 14.8, 14.3. **API-ES** positivo 533.3 (M+Na)⁺; **HRMS** (ESI-QTOF) encontrado 533.2603 (M + Na)⁺; calculado para [C₃₂H₃₃BF₂N₂O+ Na]⁺ 533.2603

³⁵⁸ Yanai, H.; Taguchi, T. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 8967-8969

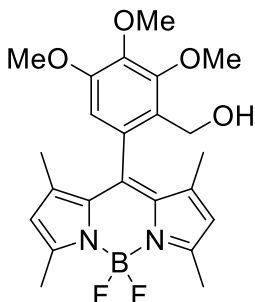
³⁵⁹ Yanai, H.; Taguchi, T. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 8967-8969.

8-(2-(hidroximetil)-5-nitro-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (225)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 6-nitro-3H-isobenzofuranona **214** (300 mg, 1.7 mmol) y 2,4-dimetil-pirrol **134** (523 μ l, 5.1 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9/1), obteniéndose 250 mg (0.6 mmol, 37%). **225**: Aceite naranja. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.38 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.01 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 2.56 (s, 6H), 1.35 (s, 6H); $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 157.1, 147.7, 146.3, 142.3, 136.0, 133.9, 130.4, 128.6, 124.6, 123.6, 122.1, 61.5, 14.8, 14.5. **HRMS** (ESI-QTOF) encontrado 400.1657 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_3 + \text{H}]^+$ 400.1644.

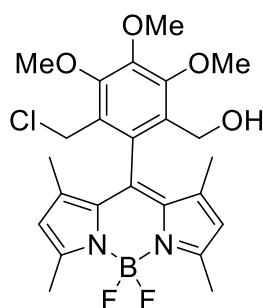
8-(2-(hidroximetil)-3,4,5-trimetoxi-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (227)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 4,5,6-trimetoxi-3H-isobenzofuranona **215**³⁶⁰ (250 mg, 1.1 mmol) y 2,4-dimetil-pirrol **134** (338 μ L, 3.3 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9/1), obteniéndose 127 mg (0.3 mmol, 26%). **227**: Aceite naranja. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (6.54 (s, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.50 (bs, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 2.55 (s, 6H), 1.50 (s, 6H). $^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 153.3, 151.9, 150.9, 140.4, 140.3, 136.4, 128.7, 126.7, 122.1, 118.8, 104.1, 59.1, 58.7, 56.1, 53.7, 12.0, 11.3. $^{19}\text{F RMN}$ (376 MHz, CDCl_3) δ - 147.62 (dq, $J_{\text{F-F}} = 110.0$, $J_{\text{B-F}} = 33.0$ Hz, 1F), -146.87 (dq, $J_{\text{F-F}} = 110.0$, $J_{\text{B-F}} = 33.0$ Hz, 1F). **HRMS** (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ encontrado 445.2109 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}]^+$ 445.2110.

³⁶⁰ King, F. E.; King, T. J. *J. Chem. Soc.* **1942**, 726-727.

8-(2-(hidroximetil)-3,4,5-trimetoxi-6-(clorometil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (229)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general 2 a partir de 7-clorometil-4,5,6-trimetoxi-3H-isobenzofuranona **216**^{361,362} (150 mg, 0.36 mmol) y 2,4-dimetilpirrol **134** (118.2 μ L, 1.10 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9/1), obteniéndose 49 mg (0.1 mmol, 28%).

Aceite naranja. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.99 (s, 2H), 4.49 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 2.56 (s, 6H), 1.48 (s, 6H). ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ -146.33 (dq, J_{F-F} = 109.4, J_{B-F} = 32.4 Hz, 1F), -145.92 (dq, J_{F-F} = 109.5, J_{B-F} = 32.6 Hz, 1F). ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃) δ 156.4, 154.6, 154.2, 147.1, 142.9, 135.2, 131.1, 130.9, 129.6, 128.8, 127.4, 124.0, 121.6, 121.6, 61.8, 61.8, 61.1, 58.5, 38.6, 14.7, 13.9. HRMS (ESI-QTOF) encontrado 493.1870 (M + H)⁺; calculado para [C₂₄H₂₈BClF₂N₂O₄ + H]⁺ 493.1877.

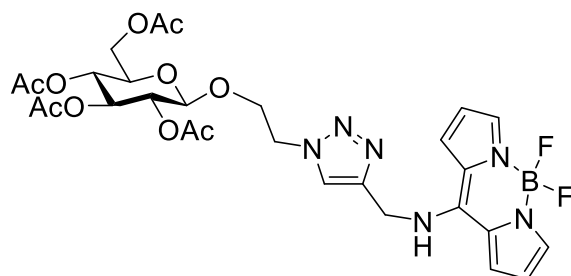
III.3.3.2 Conjugación de BODIPYs a carbohidratos sencillos

- Procedimiento general para la reacción CuAAC del alquino-BODIPY **243** con las azidas-carbohidrato **237-239**

En un matraz de fondo redondo, se pesan 1.0 eq. de **243**, 1.2 eq. de azida, 15 mol% de CuSO₄ 5H₂O y 45 mol% de ascorbato de sodio. La mezcla se disolvió en una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂/agua. La reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. A continuación se concentra el disolvente a presión reducida y el crudo se lavó con AcOEt (3x10 mL) y agua. Las fases orgánicas reunidas se juntaron, se secaron sobre Ng₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando mezclas de hexano:acetato de etilo como eluyente.

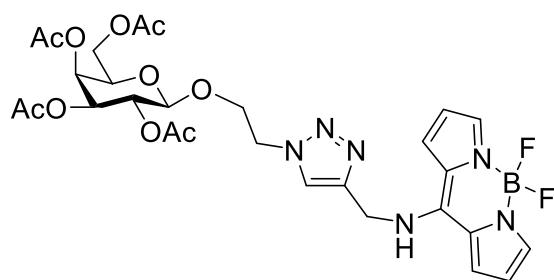
³⁶¹ King, F. E.; King, T. J. *J. Chem. Soc.* **1942**, 726-727.

³⁶² Ellerbrock, P.; Armanino, N.; Trauner, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 13414-13418.

Conjugado 244

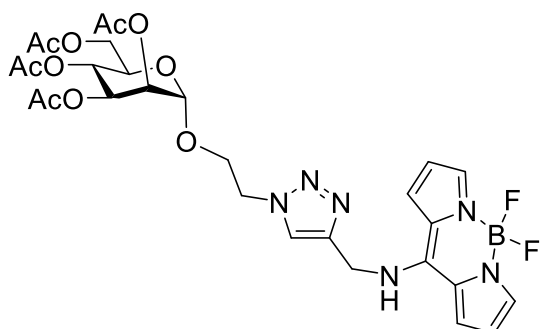
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **243** (10 mg, 0.041 mmol) y la azida **237** (20.4 mg, 0.049 mmol), CuSO₄ 5H₂O (1.5 mg, 6.12x10⁻³ mmol) y ascorbato de sodio (3.6 mg, 0.0184 mmol), obteniéndose

11.7 mg (0.0176 mmol, 43%) después de 1 h. **244**: Polvo amarillo. **p.f.** 100 - 102 °C. **[α]_D²⁵** = -9.8° (c = 0.5, MeOH); **¹H RMN** (400 MHz, CD₃OD) δ 8.00 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.38 (s, 3H), 6.55 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 5.20 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.97 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.81 (dd, *J* = 9.6, 8.0 Hz, 1H), 4.65-4.56 (m, 3H), 4.24-4.08 (m, 3H), 3.99 (ddd, *J* = 11.1, 6.6, 4.4 Hz, 1H), 3.80 (ddd, *J* = 10.1, 4.7, 2.4 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.91 (s, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, CD₃OD) δ 172.2, 171.5, 171.2, 171.2, 150.3, 143.5, 135.8, 132.8, 126.7, 125.6, 125.2, 123.5, 117.8, 115.7, 114.4, 101.6, 73.9, 72.9, 72.6, 69.7, 68.9, 62.9, 51.5, 43.3, 20.6, 20.6, 20.5, 20.5. **HRMS** (ESI+) encontrado 663.2399 (M + H)⁺; calculado para [C₂₈H₃₃BF₂N₆O₁₀ + H]⁺ 663.2397.

Conjugado 245.

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **243** (20 mg, 0.081 mmol) y la azida **238** (41.0 mg, 0.098 mmol), CuSO₄ 5H₂O (3.0 mg, 0.012 mmol) y ascorbato de sodio (7.2 mg, 0.036 mmol), obteniéndose 43.7 mg (0.066

mmol, 81%) después de 1.5 h. **245**: Polvo amarillo. **p.f.** 97 - 100 °C. **[α]_D²⁵** = 7.0° (c = 0.5, MeOH). **¹H RMN** (300 MHz, CD₃OD) δ 8.00 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.39 (s, 3H), 6.53 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.35 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.06 - 5.03 (m, 1H), 4.59 (dd, *J* = 8.8, 4.7 Hz, 3H), 4.27 - 3.93 (m, 6H), 3.60 (s, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.91 (s, 3H). **¹³C RMN** (126 MHz, CD₃OD) δ 172.1, 172.0, 171.9, 150.3, 135.8, 132.8, 128.8, 125.2, 125.1, 125.0, 117.8, 115.6, 115.1, 114.4, 97.5, 72.1, 72.1, 70.3, 69.4, 68.9, 62.8, 50.5, 43.2, 20.6, 20.6, 20.5, 20.4, 20.3. **HRMS** (FAB) encontrado 663.2398 (M + H)⁺; calculado para [C₂₈H₃₃BF₂N₆O₁₀ + H]⁺ 663.2397.

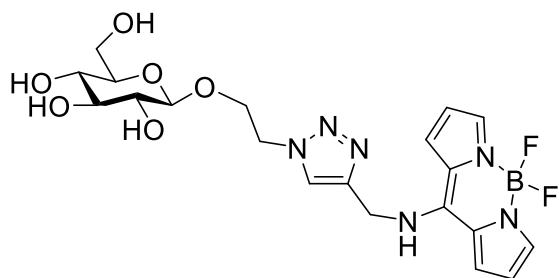
Conjugado 246

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **243** (15.0 mg, 0.036 mmol) y la azida **239** (10.6 mg, 0.043 mmol), CuSO₄ 5H₂O (1.35 mg, 0.0054 mmol) y ascorbato de sodio (7.2 mg, 0.036 mmol) obteniéndose 15.8 mg (0.0238 mmol, 66%) después de 2 h. **246**: Polvo amarillo. **p.f.** 87 - 90 °C. $[\alpha]_D^{25} = +0.104^\circ$ (c = 0.5, MeOH).

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8.12 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 6.52 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.14 (td, $J = 3.0, 1.5$ Hz, 5H), 4.82 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.68 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.18–4.02 (m, 4H), 3.92 (dt, $J = 9.7, 4.6$ Hz, 1H), 3.64–3.57 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (s, 3H). **¹³C RMN** (101 MHz, CD₃CD): δ 172.4, 171.7, 171.5, 171.4, 150.3, 143.7, 135.8, 132.7, 126.7, 125.8, 125.2, 123.5, 117.8, 115.6, 114.3, 98.6, 70.5, 70.2, 67.2, 66.9, 63.4, 51.1, 43.3, 20.6, 20.5. **HRMS** (ESI+) encontrado 663.2399 (M + H)⁺; calculado para [C₂₈H₃₃BF₂N₆O₁₀ + H]⁺ 663.2397.

- *Procedimiento general de desprotección de los glucosil BODIPYs **244-246**.*

Se disolvió el correspondiente glucosil BODIPY (**244-246**) en metanol (MeOH) (4 mL/0.1 mmol), y se añadió trietilamina (Et₃N) (1 mL/0.1 mmol). Se calentó a reflujo (70 °C) y se mantuvo a dicha temperatura durante una noche, se concentró a vacío y se filtró por una pequeña cantidad de sílice

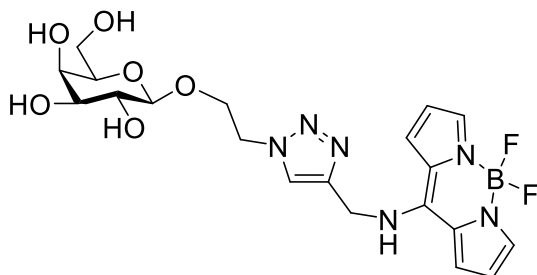
Conjugado 247

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general de desprotección a partir de **244** (61.3 mg, 0.093 mmol) con MeOH/ Et₃N (8:2) (5 mL) obteniéndose 45 mg (0.093 mmol, cuantitativa). **247**: Polvo amarillo. **p.f.** 103 - 105 °C. $[\alpha]_D^{25} = +3.2^\circ$ (c = 0.5, MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 8.7 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 3.5$ Hz, 3H), 6.52 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.64 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 4.29 (dd, $J = 7.8, 3.7$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 10.8, 5.4$ Hz, 1H), 4.06 - 3.95 (m, 1H), 3.84 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 11.8, 5.3$ Hz, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). **¹³C**

RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 50.3 35.7 32.6 26.7 25.9 125.2, 123.5, 117.9, 115.6, 114.4, 104.5, 78.1, 77.9, 74.9, 71.5, 69.0, 62.7, 60.0, 51.7, 43.3. **HRMS** (ESI+) encontrado 495.1973 (M + H)⁺; calculado para [C₂₀H₂₅BF₂N₆O₆ + H]⁺ 495.1975.

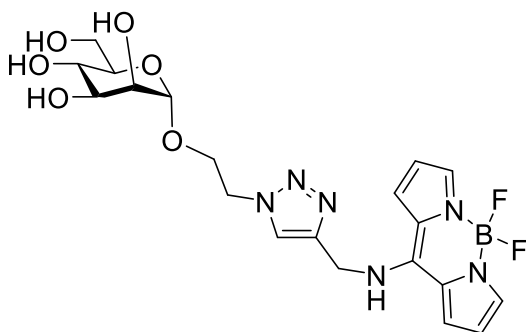
Conjugado 248



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general de desprotección a partir de **245** (43.7 mg, 0.066 mmol) con MeOH/ Et₃N (8:2) (5 mL) obteniéndose 32.6 mg, (0.093 mmol, cuantitativa). **248**: polvo amarillo. **p.f.** 103 - 105 °C. $[\alpha]_D^{25} = +3.2^\circ$ (c

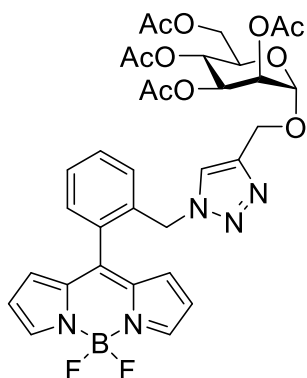
= 0.5, MeOH). **¹H RMN** (300 MHz, CD₃OD) δ 8.19 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.38 (s, 3H), 6.53 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.65 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.34-4.18 (m, 2H), 3.82 (dd, *J* = 6.4, 2.8 Hz, 1H), 3.78-3.69 (m, 3H), 3.56-3.43 (m, 3H). **¹³C RMN** (75 MHz, CD₃CD) δ 150.3, 135.7, 132.6, 126.7, 125.9, 125.2, 123.5, 117.9, 115.6, 114.3, 105.2, 76.8, 74.9, 72.4, 70.3, 69.1, 64.3, 62.6, 51.8, 43.4. **HRMS** (FAB) encontrado 495.1976 (M + H)⁺; calculado para [C₂₀H₂₅BF₂N₆O₆ + H]⁺ 495.1975

Conjugado 249



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general de desprotección a partir de **246** (48 mg, 0.073 mmol) con MeOH/ Et₃N (8:2) (5 mL) obteniéndose 36.2 mg (0.07 mmol, cuantitativa). **249**: Polvo amarillo. **p.f.** 103 - 105 °C. $[\alpha]_D^{25} = +3.2^\circ$ (c

= 0.5, MeOH). **¹H RMN** (300 MHz, CD₃OD) δ 8.06 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 3.8 Hz, 3H), 6.53 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.12 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 4.72 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.63 (dd, *J* = 6.3, 4.0 Hz, 2H), 4.10 (ddd, *J* = 10.8, 6.2, 4.4 Hz, 1H), 3.85 (dt, *J* = 7.6, 4.4 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 11.8, 2.4 Hz, 1H), 3.71 (s, 1H), 3.63 (dd, *J* = 11.8, 6.0 Hz, 1H), 3.59-3.54 (m, 2H), 3.36-3.34 (m, 1H), 3.25 (dd, *J* = 14.5, 7.3 Hz, 1H). **¹³C RMN** (126 MHz, DMSO-D₆) δ 148.4, 141.7, 133.9, 130.9, 125.1, 124.0, 123.9, 121.6, 117.1, 114.5, 113.1, 99.8, 74.1, 70.8, 70.0, 66.8, 64.8, 61.2, 49.4, 41.9. **HRMS** (ESI+) encontrado 495.1977 (M + H)⁺; calculado para [C₂₀H₂₅BF₂N₆O₆ + H]⁺ 495.1975.

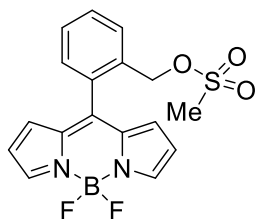
Conjugado 252

Se pesa la azida **250** (25 mg, 0.077 mmol, 1.0 eq.), propargil 2,3,4,6tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido **251** (35.9 mg, 0.093 mmol, 1.2 eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.9 mg, 0.0116 mmol, 15 mol%) y ascorbato de sodio (6.9 mg, 0.035 mmol, 45 mol%). La mezcla se disolvió en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación se concentró el disolvente a presión reducida y el crudo se lavó con AcOEt (3x10 mL) y agua. Las fases orgánicas reunidas se juntaron, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 1:9) obteniéndose 51 mg (0.072 mmol, 96%). **252**: Cristales ámbar. **p.f.** 83-85 °C. **^1H RMN** (500 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (s, 2H), 7.63-7.54 (m, 1H), 7.48 (dd, J = 16.8, 7.7 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.69-6.58 (m, 2H), 6.53 (d, J = 1.9 Hz, 2H), 5.46 (s, 2H), 5.33-5.25 (m, 2H), 5.19 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.67 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 12.2, 5.0 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 12.3, 2.1 Hz, 1H), 4.05-3.98 (m, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.97 (s, 3H). **^{13}C RMN** (126 MHz, CDCl_3) δ 70.8 70. 70.0 69.8 45.6 145.5, 143.9, 143.5, 135.4, 135.3, 133.7, 132.5, 131.0, 130.9, 130.8, 130.5, 129.9, 128.6, 123.9, 119.5, 119.4, 97.2, 69.6, 69.2, 68.8, 66.3, 62.5, 60.9, 51.9, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7. **HRMS** (ESI+) encontrado 710.2448 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; calculado para $[\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_{10} + \text{H}]^+$ 710.2445.

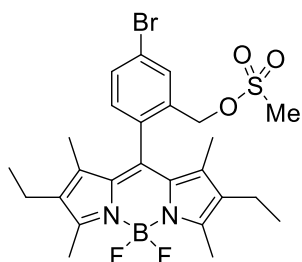
III.3.3.3 Conjugación de BODIPYs a moléculas portadoras de grupos amino

- *Procedimiento general* para la obtención de metanosulfonilmetilfenil-BODIPYs

Sobre una disolución de 8-(*orto*hidroximetil)aril-BODIPYs (0,5 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL) en atmósfera de argón, y a 0°C se adicionó trietilamina (1.5 mmol), 3,4-diaminopiridina (DMAP) (punta de espátula) y cloruro de mesilo (0.75 mmol). Al cabo de 30 min se diluyó la mezcla de reacción con 10 mL de CH_2Cl_2 y se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (10 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se reextrajo con CH_2Cl_2 (1x10mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se eliminó el disolvente a vacío y se purificó mediante cromatografía en columna con mezcla de hexano/acetato como eluyente, obteniéndose los mesilatos correspondientes.

8-(2-(metanosulfonilmetil)-fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (270)

El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **204** (100 mg, 0,33 mmol), trietilamina (140 μ l, 1.0 mmol) y cloruro de mesilo (35 μ l, 0,50 mmol) y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 119 mg (0.31 mmol, 96%). **270**: Sólido naranja. **p.f.** = 129-131 °C. **^1H RMN** (400 MHz, CDCl_3) δ 7,95 (s, 2H), 7,66 – 7,57 (m, 2H), 7,53 (td, J = 7,4, 1,6, 1H), 7,40 (dd, J = 7,5, 0,9, 1H), 6,70 (d, J = 4,3, 2H), 6,52 (d, J = 4,2, 1H), 5,10 (s, 2H), 2,69 (s, 3H); **^{13}C RMN** (101 MHz, CDCl_3) δ 145,5 (x2), 144,2, 135,6 (x2), 133,3, 132,3, 131,5 (x2), 130,7 (x2), 130,6, 15 129,3, 119,4 (x2), 69,1, 37,1. **^{19}F RMN** (376 MHz, CDCl_3) δ -143,83 (dq, J = 103,3, 29,3), -146,90 (dq, J = 103,7, 28,1). **HRMS** (ESI+) encontrado 394,1210 ($\text{M} + \text{NH}_4$)⁺; calculado para $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BF}_2\text{N}_2 + \text{NH}_4]^+$ 394,1206.

8-(4-(bromo)-2-(metanosulfonilmetil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (220)

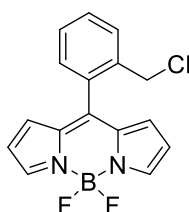
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **220** (200 mg, 0,41 mmol), trietilamina (172 μ l, 1.2 mmol) y cloruro de mesilo (42 μ l, 0,60 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 227 mg (0.40 mmol, 98%). **220**: Sólido naranja. **p.f.** = 163-165 °C; δ **^1H RMN** (400 MHz, CDCl_3) δ = 5 7,80 (s, 1H), 7,69 (d, J = 8,1, 1H), 7,20 (d, J = 8,1, 1H), 5,01 (s, 2H), 2,69 (s, 3H), 2,53 (s, 6H), 2,31 (q, J = 7,6, 4H), 1,29 (s, J = 11,0, 6H), 0,99 (t, J = 7,6, 6H). **^{13}C RMN** (126 MHz, CDCl_3) δ 155,3, 138,2, 135,0, 134,6, 133,8, 133,7, 133,6, 133,4, 130,9, 130,1, 123,8, 68,5, 36,6, 17,2 (x2), 14,7 (x2), 12,8 (x2), 11,7 (x2). **^{19}F RMN** (376 MHz, CDCl_3) δ -145,7 (dq, $J_{\text{F-F}}$ =107,46, $J_{\text{F-B}}$ =34,06), -146,40 (dq, $J_{\text{F-F}}$ =107,46, $J_{\text{F-B}}$ =34,06).

- Procedimiento general para la obtención de clorometilfenil-BODIPYs

Sobre una disolución de 8-(*ort*hidroximetil)aril-BODIPYs (0,5 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL) en atmósfera de argón, y a 0°C se adicionó trietilamina (1.5 mmol), 3,4-diaminopiridina (DMAP) (una punta de espátula) y cloruro de mesilo (0.75 mmol). Se permitió que la mezcla alcanzara lentamente temperatura ambiente y se dejó agitando durante 3 horas, A continuación se diluyó la mezcla de reacción con 10 mL de CH_2Cl_2 y se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (10 mL). Se separaron las

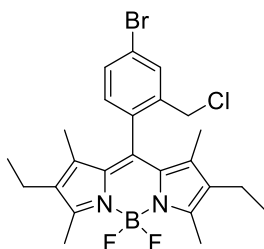
fases y la fase acuosa se reextrae con CH_2Cl_2 (1x10mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtró, se eliminó el disolvente a vacío y se purificó mediante cromatografía en columna empleando como eluyente la mezcla de hexano/acetato indicada en cada caso.

8-(2-(clorometil)-fenil)- 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (274)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **204** (58 mg, 0,19 mmol), trietilamina (80 μL , 0,57 mmol) y cloruro de mesilo (20 μL , 0,28 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9:1), obteniéndose 52 mg (0,16 mmol, 86%). **274**: Aceite naranja, $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,96 (s, 2H), 7,66 (dd, J = 7,9, 0,7, 1H), 7,57 (td, J = 7,6, 1,4, 1H), 7,44 (td, J = 7,5, 1,3 Hz, 1H), 7,34 (dd, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H), 6,71 (d, J = 4,3 Hz, 2H), 6,51 (d, J = 4,6 Hz, 2H), 4,50 (s, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ = 145,3 (x2), 144,5, 136,5, 135,7 (x2), 132,6, 131,5 (x2), 130,6 (x2), 130,5, 128,2, 119,1 (x2), 43,5. $^{19}\text{F-RMN}$ (376 MHz, CDCl_3) δ = -145,51 (q, J = 28,9 Hz), 145,52 (q, J = 28,8 Hz). **HRMS** (ESI+) encontrado 317,0839 ($M + H$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BClF}_2\text{N}_2 + H]^+$ 317,0823.

8-(4-(bromo)-2-(clorometil)-fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (275)



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **220** (12 mg, 0,02 mmol), trietilamina (8 μL , 0,06 mmol) y cloruro de mesilo (2,3 μL , 0,3 mmol), y se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 8 mg (0,16 mmol, 82%). **275**: Sólido rosa. **p.f.** = 194-196 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 7,85 (d, J = 2,0, 1H), 7,59 (dd, J = 8,1, 2,0 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,46 (s, 2H), 2,54 (s, 6H), 2,30 (q, J = 7,6 Hz, 4H), 1,30 (s, 6H), 0,98 (t, J = 7,6 Hz, 6H). $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3) δ = 155,1, 138,1, 137,6, 135,5, 133,8, 133,5, 132,5, 130,6, 130,4, 130,3, 123,8, 42,7, 17,31 (x2), 14,80 (x2), 12,85 (x2), 11,83 (x2). **HRMS** (ESI+) encontrado 508,1144. ($M + H$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{BBrClF}_2\text{N}_2 + H]^+$ 507,6497.

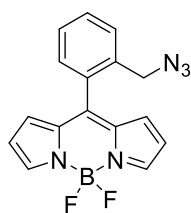
- Procedimientos generales para la preparación de azidometil-BODIDYs

Método A. Mediante la reacción de desplazamiento de los mesilatos con NaN_3 . Sobre una disolución del 8-(ortohidroximetil)aryl-BODIPY (0,5 mmol) correspondiente en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL) en atmósfera de argón, y a 0°C se adicionó trietilamina (1,5 mmol), 3,4-diaminopiridina (DMAP) (una punta de espátula) y cloruro de mesilo (0,75

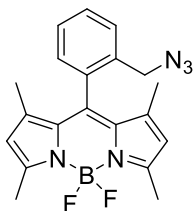
mmol). Al cabo de 30 min se diluyó la mezcla de reacción con 10 mL de CH_2Cl_2 y se añadió una disolución saturada de bicarbonato sódico (10 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se reextrajo con CH_2Cl_2 (1x10mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo fue utilizado directamente en la siguiente etapa sintética. El O-mesil derivado se disolvió en DMF anhidra (3 mL) y bajo atmósfera de argón, se trató con NaN_3 (1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Una vez comprobado por CCF la desaparición del material de partida, se diluyó la mezcla de reacción con 10 mL de acetato de etilo y se añadió una agua (10 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se reextrajo con acetato de etilo (1x10mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua y con una disolución saturada de NaCl y se secaron sobre MgSO_4 anhidro. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó mediante cromatografía en columna con mezcla de hexano/acetato como eluyente, obteniéndose los azido-BODIPYs deseados.

Método B. Mediante la reacción de Mitsunobu. Sobre una disolución del 8-(ortohidroximetil)-aril-BODIPY correspondiente (0,2 mmol) en THF anhidro (3 mL) y bajo atmósfera de argón se adicionó trifenilfosfina (0,24 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C , y se añadió secuencialmente dietilazocarboxilato (0,24 mmol) y difenilfosforilazida (0,24 mmol). La mezcla de reacción se deja alcanzar la temperatura ambiente y después de 17 horas se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se disuelve en CH_2Cl_2 y se lava con agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, y se concentró a vacío. Se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo.

8-(2-azidometil-fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (276)

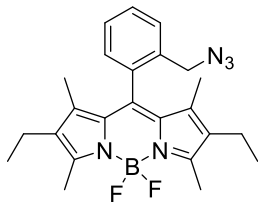


El producto se preparó siguiendo el método A a partir del mesilato **270** (116 mg, 0,30 mmol) y NaN_3 (40 mg, 0,60 mmol), se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9:1), obteniéndose 85 mg (0.26 mmol, 88%). **276**: Sólido naranja. **p.f.** = 83-85 $^\circ\text{C}$. **^1H RMN** (500 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (s, 2H), 7.58(s, 2H), 7.46 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 7.37(d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.70(s, 2H), 6.52(s, 2H), 4.32(s, 2H); **^{13}C RMN** (126 MHz, CDCl_3) δ 145.3, 144.7, 135.6, 134.7, 132.5, 131.1, 130.5, 130.4, 129.4, 128.0, 119.1, 52.2. **HRMS** (ESI+) encontrado 324,1235 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BF}_2\text{N}_5 + \text{H}]^+$ 324,1232.

8-(2-(azidometil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (277)

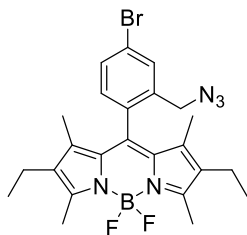
El producto se preparó siguiendo el método A a partir de **211** (608 mg, 1.72 mmol), Et₃N (0.73 mL, 5.15 mmol) y cloruro de mesilo (0.20 mL, 2.5 mmol). El mesilato generado **271** se trató con NaN₃ (230 mg, 3.52 mmol). Se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 493 mg (1.30 mmol, 90%).

277: Sólido rojo. p.f. = 98-100 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,58-7,53 (m, 2H), 7,46 (dt, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 1H), 7,43-7,38 (m, 1H), 6,00 (s, 2H), 4,34 (s, 2H), 2,56 (s, 6H), 1,35 (s, 6H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 156.2, 142.9, 138.9, 133.9, 133.8, 131.0, 129.9, 129.1, 128.9, 128.7, 121.6, 52.1, 14.8, 14.1. **API-ES** positivo 577.4 (M+Na)⁺. **HRMS** (ESI+) encontrado 380.1874 (M + H)⁺; calculado para [C₂₀H₂₀BF₂N₅ + H]⁺ 380.1858.

8-(2-(azidometil)-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (278)

El producto se preparó siguiendo el método A a partir de del alcohol **212** (50 mg, 0.12 mmol), Et₃N (50 µl, 0.36 mmol) y cloruro de mesilo (10 µl, 0.18 mmol). El crudo resultante **272** se trató con NaN₃ (15 mg, 0.24 mmol). Se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 40 mg (0.1 mmol, 78%).

278: Sólido rojo. Punto de fusión. 82-85 °C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.63 – 7.35 (m, 3H), 7.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 2.54 (s, 6H), 2.31 (q, *J* = 7.4 Hz, 4H), 1.25 (s, 6H), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 154.4, 138.1, 137.3, 134.5, 134.1, 133.2, 130.3, 129.7, 128.9, 128.9, 128.7, 52.1, 17.2, 14.7, 12.6, 11.3. **MS** (API-ES modo positivo): 436.1 [M+H]⁺.

8-(2-azidometil-4-bromo-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno (279)

El producto se preparó siguiendo el método B a partir de **220** (97 mg, 0,2 mmol), trifenilfosfina (63 mg, 0,24 mmol), dietilazocarboxilato (47 µl, 5 0,24 mmol) y difenilfosforilazida (54 µl, 0,24 mmol), y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de

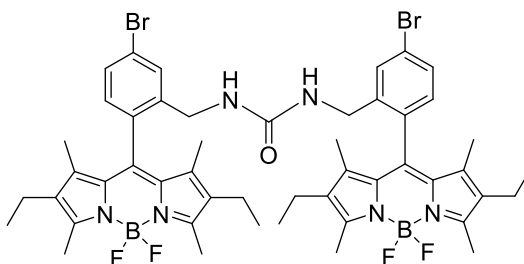
sílice empleando como eluyente una mezcla hexano /acetato de etilo (8:2), obteniéndose 43 mg (0.08 mmol, 42 %). **279**: Sólido rojo. **p.f.** 65-67 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7,75 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 7,59 (dd, *J* = 8,1, 2,0 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 2,53 (s, 6H), 2,30 (q, *J* = 7,6 Hz, 4H), 1,28 (s, 6H), 0,98 (t, *J* = 7,5 Hz, 6H). **¹³C RMN** (101 MHz, CDCl₃) δ: 155,1, 137,9, 136,7, 135,8, 133,6, 133,4, 132,2, 131,7, 130,7, 130,1, 123,9, 51,7, 17,3 (x2), 14,8 (x2), 12,8 (x2), 15 11,7 (x2). **¹⁹F RMN** (376 MHz, CDCl₃) δ = -146,18 (q, *J* = 36,6 Hz). **HRMS** (ESI+) encontrado 514,1585 (M + H)⁺; calculado para [C₂₄H₂₇BBBrF₂N₅+H]⁺ 514,1589.

- *Procedimiento general para la síntesis de bis-bodipys*

Sobre una disolución del correspondiente 8-(2-azidometil)-fenil -BODIPY (0.20 mmol) y PPh₃ (0.25 mmol) en 1,4-dioxano (20 mL) se añadió buffer el TEAB 1M (0.44 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción hasta total desaparición del material de partida. Se eliminó a continuación el disolvente a presión reducida y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente la mezcla de hexano/acetato de etilo indicada en cada caso.

En la mayoría de los casos, tras este protocolo se observa la presencia de cantidades variables de óxido de trifenilfosfina contaminando los bis-BODIPYs. Para su eliminación, se disuelve el residuo purificado en la mínima cantidad posible de acetato de etilo, se carga sobre una pequeña columna de celita y se eluye en primer lugar con eter dietílico y a continuación con acetato de etilo. En otras ocasiones, es posible lograr la cristalización del óxido de trifenilfosfina con mezcla de hexano/éter/acetato de etilo, quedando en disolución la urea sin contaminar.

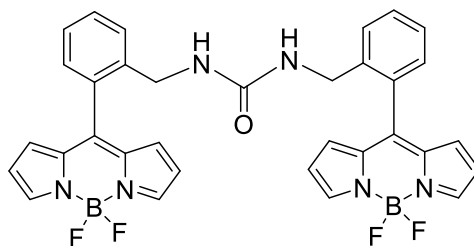
Bis-BODIPY 280



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la azida **279** (14.8 mg, 0.029 mmol), trifenilfosfina (9 mg, 0.035 mmol) y buffer TEAB 1M (65 µL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 26 mg (0.027 mmol, 90 %). **280**: **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.57 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.48 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.49 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.10 (d, *J*

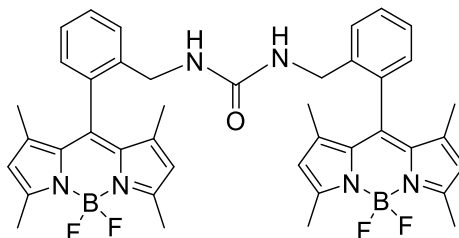
= 6.4 Hz, 4H), 2.45 (s, 13H), 2.24 (q, $J = 7.5$ Hz, 8H), 1.27 (s, 14H), 0.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 11H). **^{13}C RMN** (101 MHz, CDCl_3) δ 157.1, 154.5, 140.2, 138.2, 137.5, 133.4, 132.5, 131.4, 131.1, 130.4, 130.0, 123.7, 77.5, 42.0 (x2), 17.1(x2), 14.7 (x2), 12.5 (x2), 11.6 (x2). **^{19}F RMN** (376 MHz, CDCl_3) δ -144.4 (dq, $J_{\text{F-F}} = 103.0$, $J_{\text{F-B}} = 31.2$ Hz, 2F), -147.3 (dq, $J_{\text{F-F}} = 110.4$, $J_{\text{F-B}} = 29.5$ Hz, 2F). **MS** (API-ES modo positivo) 1025.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. **HRMS (ESI+)** encontrado 1025.28798 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{B}_2\text{Br}_2\text{F}_4\text{ON}_6 + \text{Na}]^+$ 1025.30594.

Bis-BODIPY 283



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la azida **276** (20 mg, 0.06 mmol), trifenilfosfina (28 mg, 0.1 mmol) y buffer TEAB 1M (160 μL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 9:1), obteniéndose 57 mg (0.09 mmol, 92 %). **283**: **^1H -RMN** (400 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (s, 3H), 7.44 (dt, $J = 13.1$, 7.9 Hz, 4H), 7.33 (td, $J = 7.3$, 1.6 Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 15.2$ Hz, 4H), 6.66 (d, $J = 4.2$ Hz, 4H), 6.45 (dd, $J = 4.3$, 1.9 Hz, 4H), 4.33 – 4.24 (m, 2H), 4.11 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H). **^{13}C -RMN** (101 MHz, CDCl_3) δ 157.0, 146.9, 144.5, 138.9, 135.4, 131.3, 131.1, 130.3, 130.0, 128.6, 126.8, 119.0, 42.8. **^{19}F -RMN** (376 MHz, CDCl_3) δ -141.3 (dq, $J_{\text{F-F}} = 104.1$, $J_{\text{F-B}} = 31.1$ Hz, 2F), -151.0 (dq, $J_{\text{F-F}} = 104.5$, $J_{\text{F-B}} = 26.9$ Hz, 2F). **HRMS** (ESI+) encontrado 621.23821 ($\text{M} + 2\text{H}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{B}_2\text{F}_4\text{O}\text{N}_6 + 2\text{H}]^+$ 621.23704.

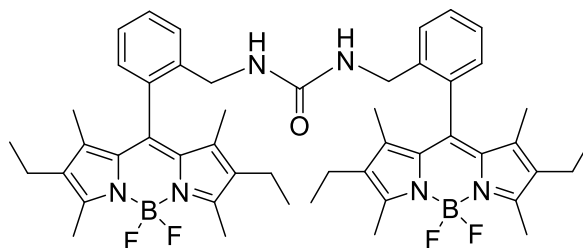
Bis-BODIPY 284



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de la azida **277** (20 mg, 0.05 mmol), trifenilfosfina (16 mg, 0.06 mmol) y buffer TEAB 1M (93 μL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 36 mg (0.05 mmol, 95 %). **284**: **^1H RMN** (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49 – 7.31 (m, 6H), 7.21 –

7.12 (m, 2H), 5.96 (s, 4H), 4.13 (d, $J = 1.7$ Hz, 4H), 2.51 (s, 12H), 1.33 (s, 12H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 157.8, 155.8, 143.1, 140.5, 137.3, 132.9, 131.0, 129.7, 128.5, 128.2, 128.0, 121.5, 42.2, 14.6, 14.0. **MS** (API-ES modo positivo) 733.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Bis-BODIPY 285

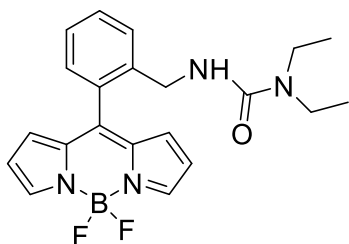


El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de **278** (20 mg, 0.046 mmol), trifenilfosfina (14 mg, 0.06 mmol) y buffer TEAB 1M (100 μL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 8:2), obteniéndose 30 mg (0.041 mmol, 90 %). **285**: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.52 – 7.31 (m, 4H), 7.15 (d, $J = 7.3$ Hz, 6H), 4.74 (s, 1H), 4.12 (s, 4H), 2.47 (s, 8H), 2.24 (q, $J = 7.5$ Hz, 12H), 1.24 (d, $J = 7.3$ Hz, 12H), 1.01 – 0.52 (m, 12H). **MS** (API-ES modo positivo) 846.5813 $[\text{M}+2\text{H}]^+$.

Procedimiento general de la síntesis de ureas asimétricas

Sobre una disolución de 8-(2-azidometil-fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno **276** (0.1 mmol) y PPh_3 (0.12 mmol) en 1,4-dioxano (10 mL) se trató con buffer TEAB 1M (0.22 mmol) y con amina (0.26 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción hasta la desaparición del material de partida (5-12 h), se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando como eluyente la mezcla de hexano /acetato de etilo indicada en cada caso.

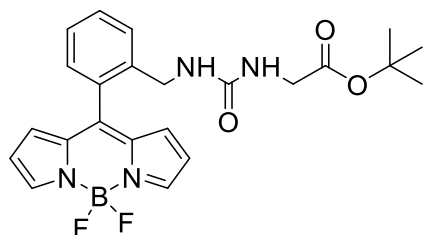
Conjugado 286



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de azido-BODIPY **276** (30 mg, 0.09 mmol), la amina **287** (25 μL , 0.24 mmol), trifenilfosfina (29 mg, 0.11 mmol) y buffer TEAB 1M (206 μL , 0.2 mmol), y se purificó por cromatografía en columna (hexano /acetato de etilo 1:1), obteniéndose 34 mg (0.084 mmol, 93 %). **286**: ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (s, 2H), 7.65 – 7.55 (m, 1H),

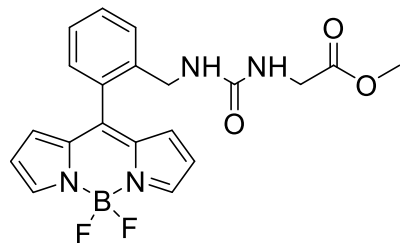
7.50 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 7.36 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 3H), 6.75 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 6.54 – 6.46 (m, 2H), 4.44 (m, 1H), 4.38 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.05 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.00 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 155.7, 145.4, 143.6, 138.0, 134.3, 130.6, 129.9, 129.2, 129.0, 128.2, 125.6, 117.8, 117.8, 117.7, 76.2, 76.0, 75.7, 42.2, 39.9, 28.7, 12.7. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -143.8 – -144.4 (m, 1F), -147.4 (dq, $J_{\text{F-F}} = 103.9$, $J_{\text{F-B}} = 28.1$ Hz, 1F). HRMS (ESI+) encontrado 397.82452. ($\text{M} + \text{H}$)⁺; calculado para $[\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O} + \text{H}]^+$ 397.19362.

Conjugado 292



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de azido-BODIPY **276** (21 mg, 0.065 mmol), la amina **288** (27 mg, 0.17 mmol), trifenilfosfina (21 mg, 0.078 mmol) y buffer TEAB 1M (137 μL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 6:4), obteniéndose 28 mg (0.061 mmol, 94 %). **292**: ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (s, 2H), 7.56 (ddd, $J = 7.9, 1.4, 0.7$ Hz, 1H), 7.49 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 7.36 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 2H), 6.72 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 6.53 – 6.46 (m, 2H), 4.74 – 4.60 (m, 2H), 4.31 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.73 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 170.1, 157.2, 146.3, 144.8, 138.6, 135.5, 131.6, 131.05, 130.3, 130.1, 128.6, 126.9, 118.9, 82.1, 43.0, 42.6, 28.2. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -143.73 (dq, $J_{\text{F-F}} = 104.0$, $J_{\text{F-B}} = 29.8$ Hz, 1F), -147.97 (dq, $J_{\text{F-F}} = 104.2$, $J_{\text{F-B}} = 28.0$ Hz, 1F). HRMS (ESI+) encontrado 455.20736 ($\text{M} + \text{H}$)⁺ y 477.18784 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺; calculado para $[\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_3 + \text{H}]^+$ 455.20187 y para $[\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_3 + \text{Na}]^+$ 477.20187

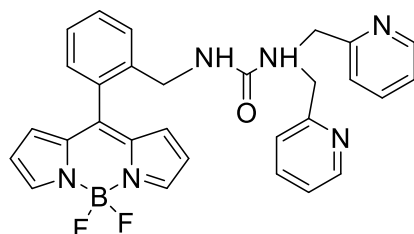
Conjugado 294



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de azido-BODIPY **276** (17 mg, 0.052 mmol), la amina **289** (12 mg, 0.14 mmol), trifenilfosfina (17 mg, 0.06 mmol) y buffer TEAB 1M (117 μL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 1:1), obteniéndose 21 mg (0.05 mmol, 95 %). **294**: ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (s, 2H), 7.70 – 7.63 (m, 2H), 7.56 – 7.44 (m, 4H), 7.37 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J = 9.4, 4.2$ Hz, 2H), 6.55 – 6.45 (m, 2H), 4.69 (q, $J = 5.3, 4.8$ Hz, 2H), 4.33 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.84 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.71 (s, 3H). ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 171.2, 156.9, 144.6, 138.3,

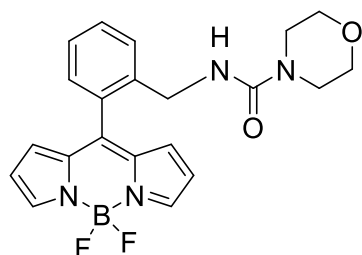
135.3, 132.1, 132.0, 132.0, 131.4, 130.9, 130.2, 129.9, 128.6, 128.5, 128.5, 126.8, 118.8, 52.2, 42.6, 42.0. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -148.80 (dq, $J_{\text{F-F}} = 63.1$, , $J_{\text{F-B}} = 30.2$ Hz). **MS** (API-ES modo positivo) 414.42001 $[\text{M}+2\text{H}]^+$.

Conjugado 295



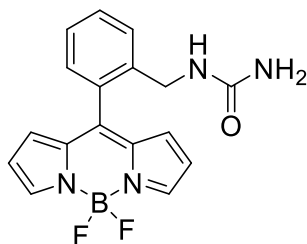
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de azido-BODIPY **276** (20 mg, 0.06 mmol), la amina **290** (18 μL , 0.1 mmol), trifenilfosfina (20 mg, 0.08 mmol) y buffer TEAB 1M (160 μL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 7:3), obteniéndose 30 mg (0.058 mmol, 94 %). **295**: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.44 – 8.37 (m, 2H), 7.90 (s, 2H), 7.55 (td, $J = 7.7$, 1.9 Hz, 3H), 7.48 (dd, $J = 6.6$, 5.2 Hz, 2H), 7.37 (td, $J = 7.4$, 1.3 Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 7.6$, 1.5 Hz, 1H), 7.14 (ddd, $J = 7.7$, 4.9, 1.1 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.77 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 6.45 (dd, $J = 4.3$, 1.8 Hz, 2H), 4.44 (t, $J = 4.4$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 196.7, 191.4, 159.6, 158.2, 149.1, 146.5, 144.7, 139.1, 137.1, 135.7, 132.1, 131.3, 130.2, 130.2, 128.6, 126.6, 123.0, 122.7, 118.9, 118.9, 77.6, 77.6, 77.2, 76.9, 53.2, 43.0. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -145.48 (dq, $J_{\text{F-F}} = 58.0$, $J_{\text{F-B}} = 29.1$ Hz). **HRMS** (ESI+) encontrado 523.22330 ($\text{M} + \text{H}^+$); calculado para $[\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BF}_2\text{N}_6\text{O} + \text{H}]^+$ 522.21914.

Conjugado 296



El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de azido-BODIPY **276** (20 mg, 0.06 mmol), la amina **291** (14 μL , 0.16 mmol), trifenilfosfina (187 mg, 0.7 mmol) y buffer TEAB 1M (135 μL), y se purificó por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 1:1), obteniéndose 23 mg (0.06 mmol, 95 %). **296**: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (s, 2H), 7.74 – 7.62 (m, 1H), 7.58 – 7.42 (m, 2H), 7.41 – 7.27 (m, 1H), 6.76 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 6.56 – 6.47 (m, 2H), 4.59 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.53 – 3.44 (m, 4H), 3.02 (dd, $J = 5.7$, 4.2 Hz, 4H). ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ 157.0, 147.0, 144.7, 138.7, 135.3, 132.3, 132.2, 131.7, 131.1, 130.4, 129.7, 128.7, 128.6, 127.1, 119.0, 66.4, 43.9, 43.7. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3) δ -142.49 (dq, $J_{\text{F-F}} = 103.1$, $J_{\text{F-B}} = 30.3$ Hz, 1F), -149.20 (dq, $J_{\text{F-F}} = 103.5$, $J_{\text{F-B}} = 27.6$ Hz, 1F). **MS** (API-ES modo positivo) 411.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Conjugado 297



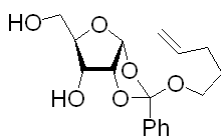
El producto se preparó siguiendo el procedimiento general a partir de azido-BODIPY **276** (20 mg, 0.06 mmol), hidróxido amónico (25% w/w) (12 μ L, 0.156 mmol), trifenilfosfina (28 mg, 0.1 mmol) y buffer TEAB 1M (160 μ L), y se purificó por cromatografía (hexano/acetato de etilo 2:8), obteniéndose 18 mg (0.05 mmol, 88 %). **298**: $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (s, 2H), 7.53 (dd, $J = 22.4, 7.6$ Hz, 2H), 7.37 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 6.56 – 6.43 (m, 2H), 4.72 (s, 1H), 4.30 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.18 (s, 2H). $^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 157.8, 146.4, 144.6, 138.3, 135.4, 131.4, 130.9, 130.2, 130.0, 128.7, 126.8, 118.9, 118.9, 77.3, 77.0, 76.7, 42.6. **HRMS** (ESI+) encontrado 363.12003 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$; calculado para $[\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{BOF}_2 + \text{Na}]^+$ 362.13413.

IV. CAPÍTULO 4.

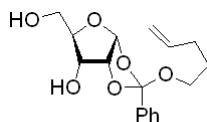
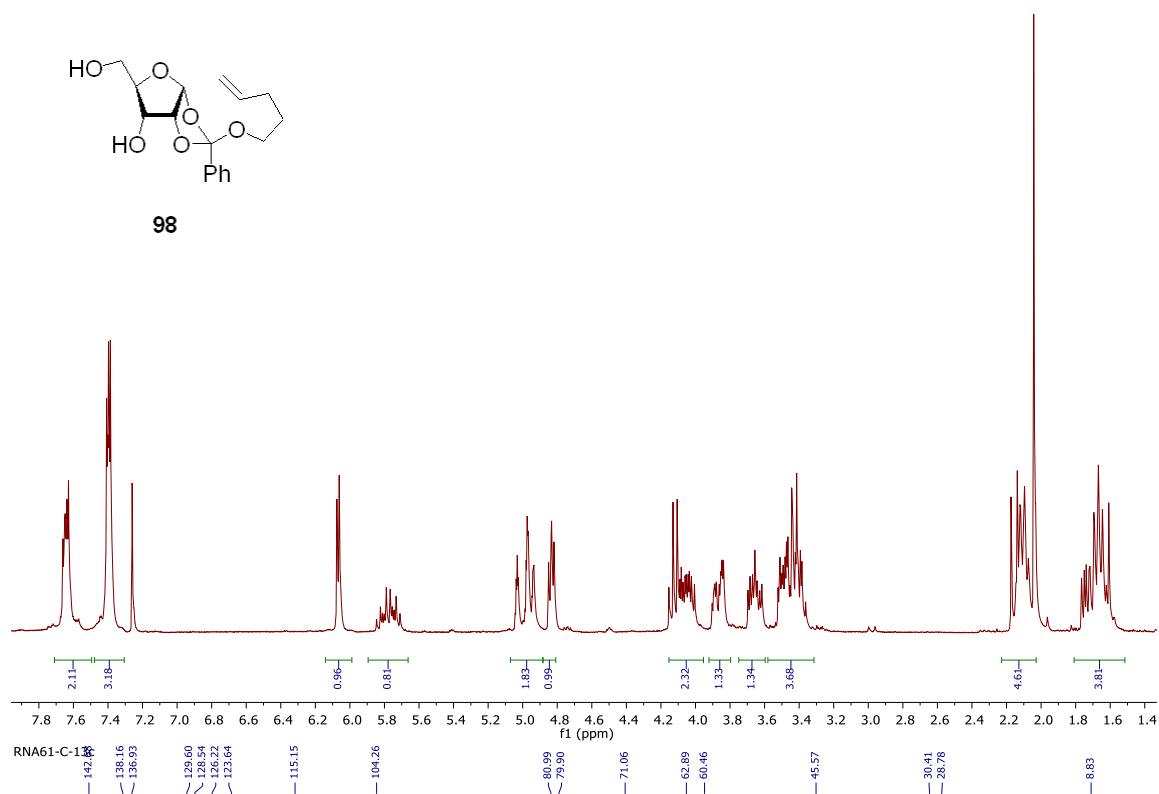
ANEXOS

A continuación se adjuntan una selección espectros:

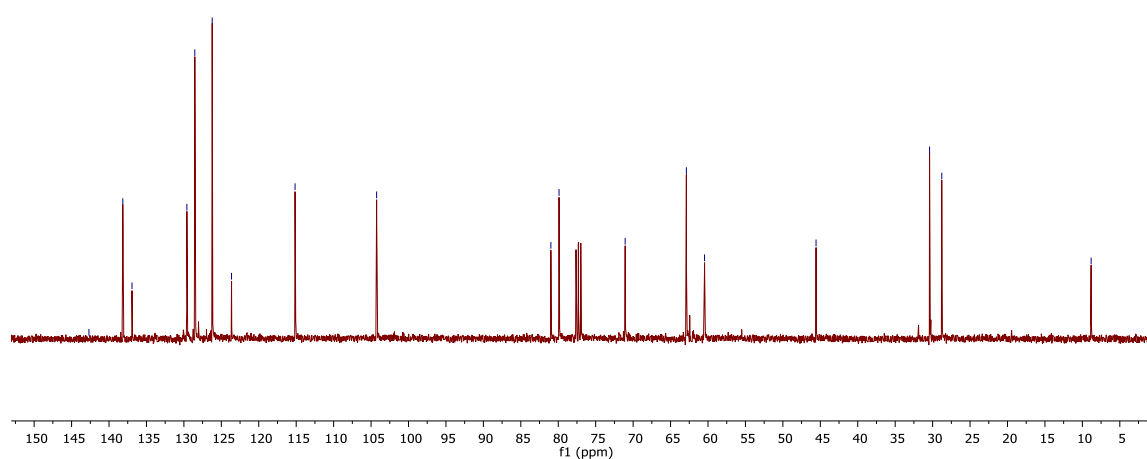
rna61-c
STANDARD 1H OBSERVE



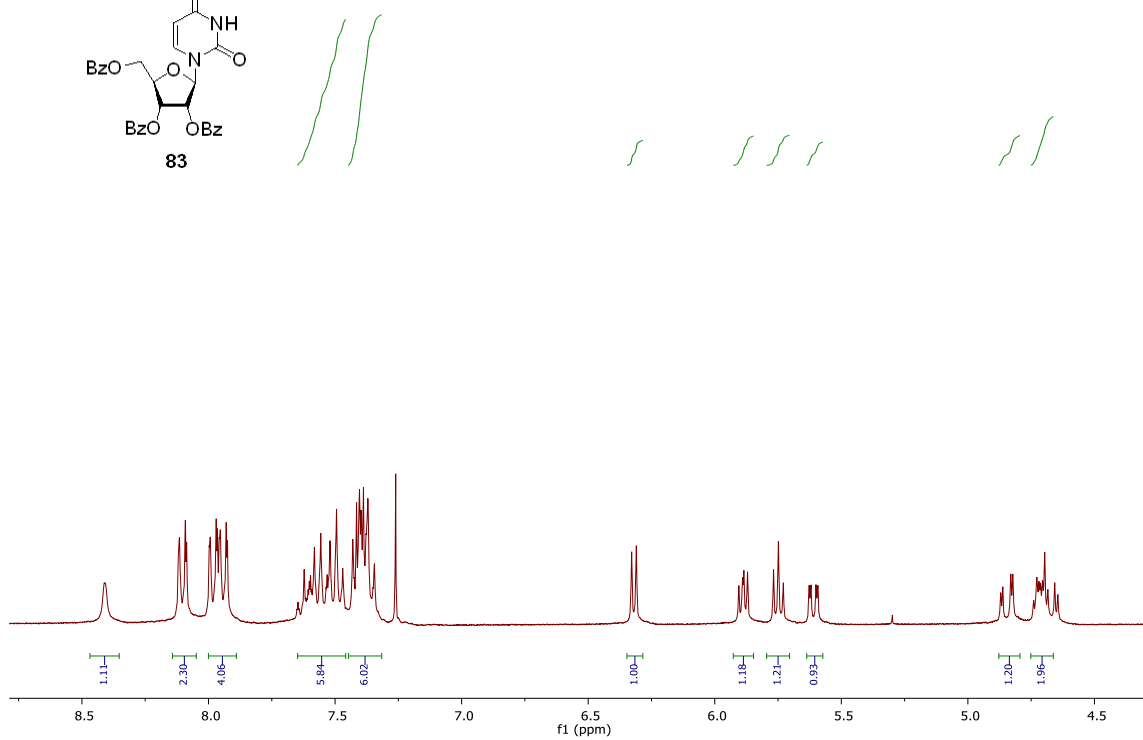
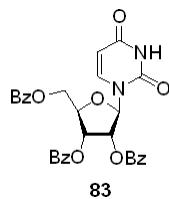
98



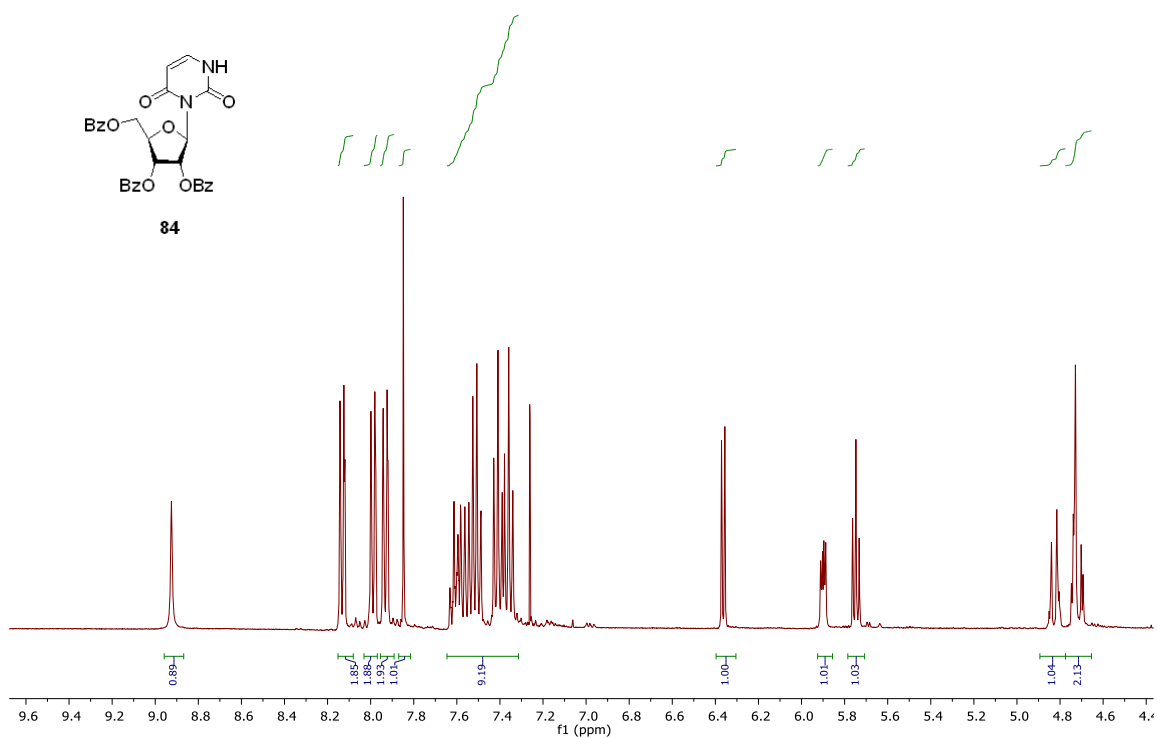
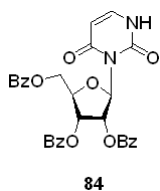
98

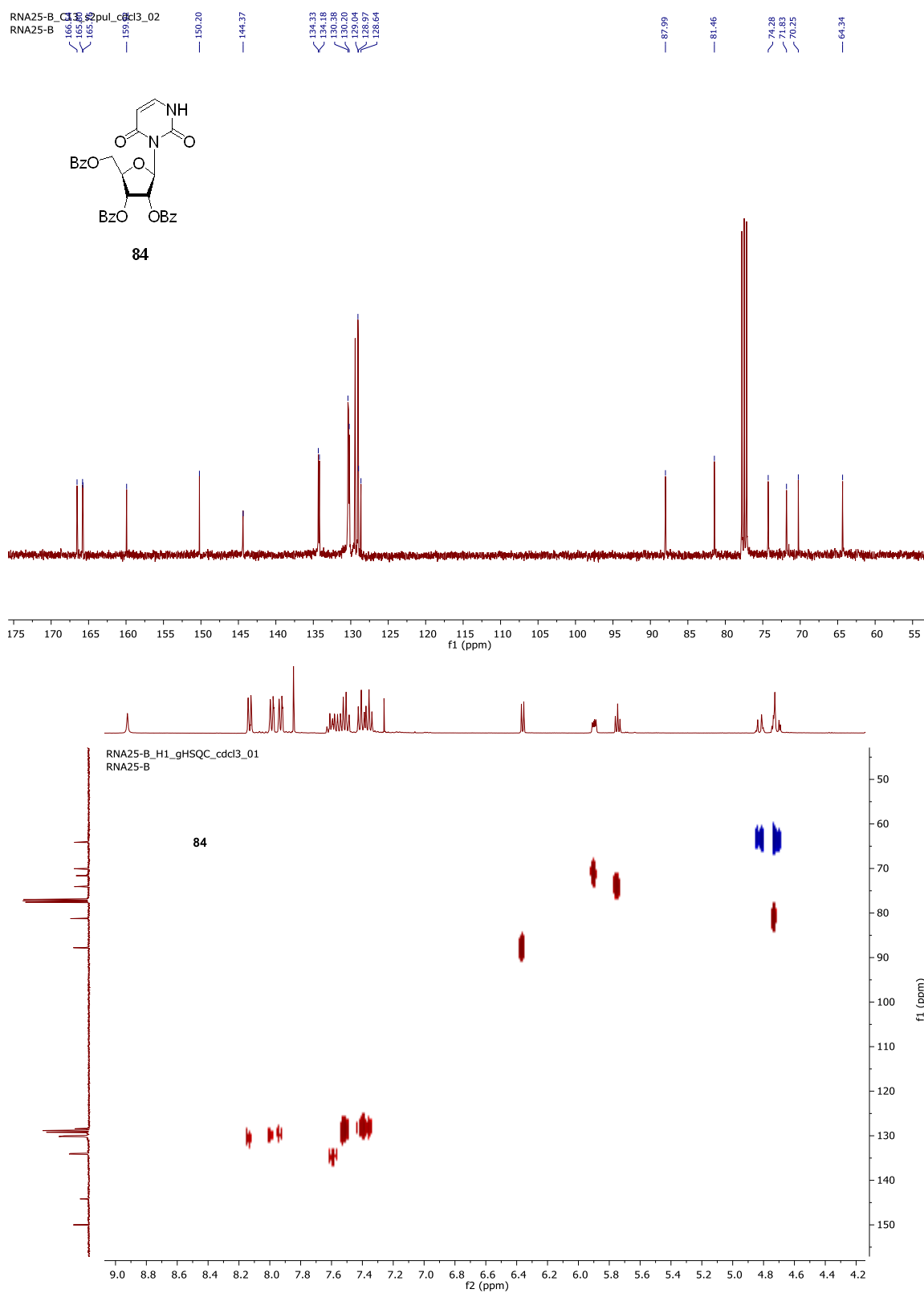


RNA25C
STANDARD 1H OBSERVE

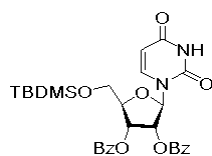


RNA25-B_H1_s2pul_cdcl3_01
RNA25-B

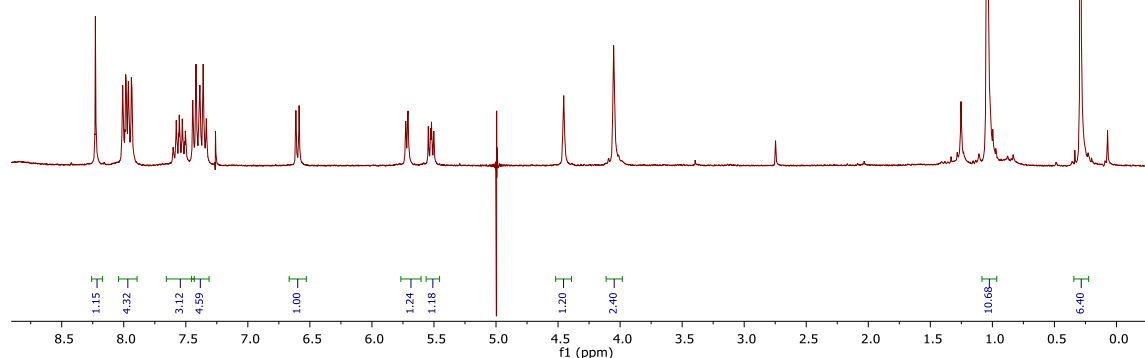




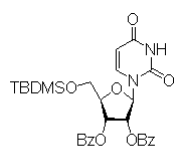
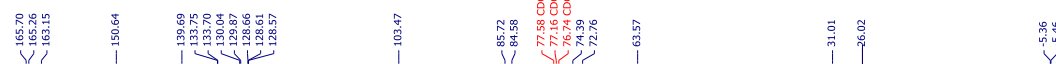
rna51a1
STANDARD 1H OBSERVE



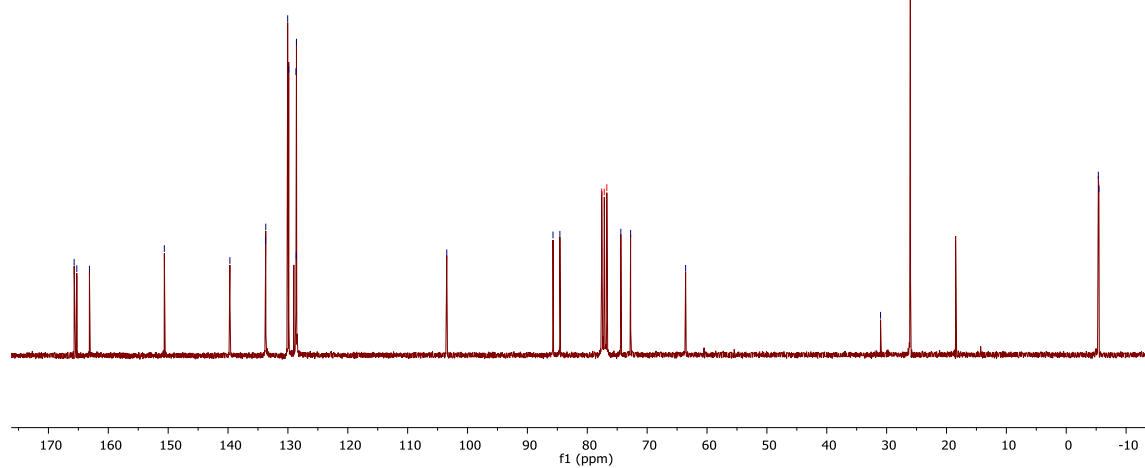
107

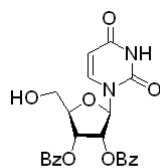


RNA40-B.50.fid

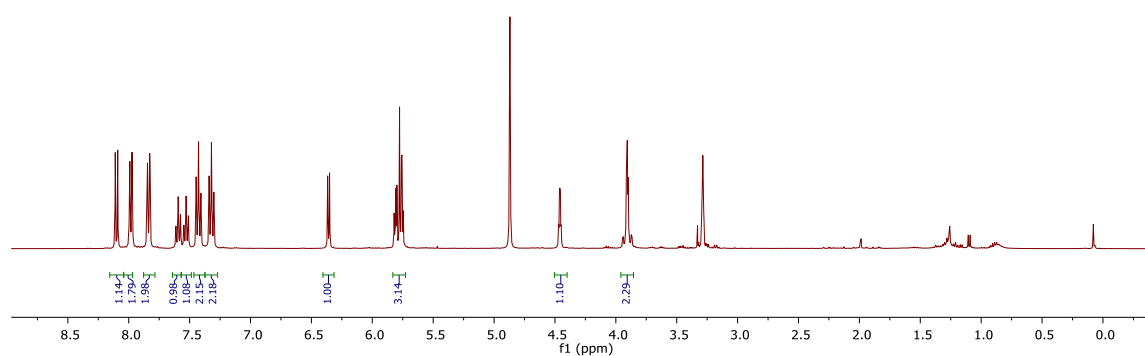
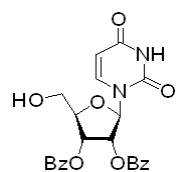


107

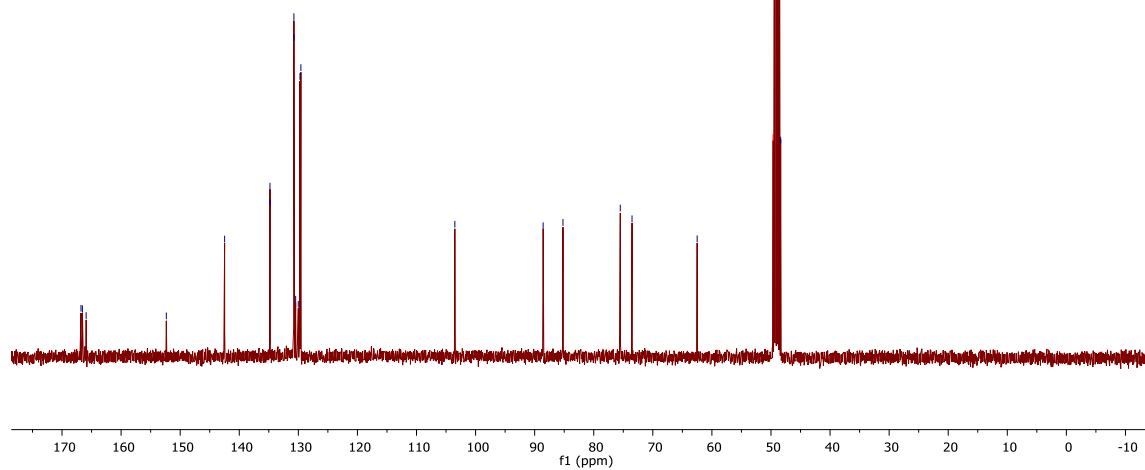


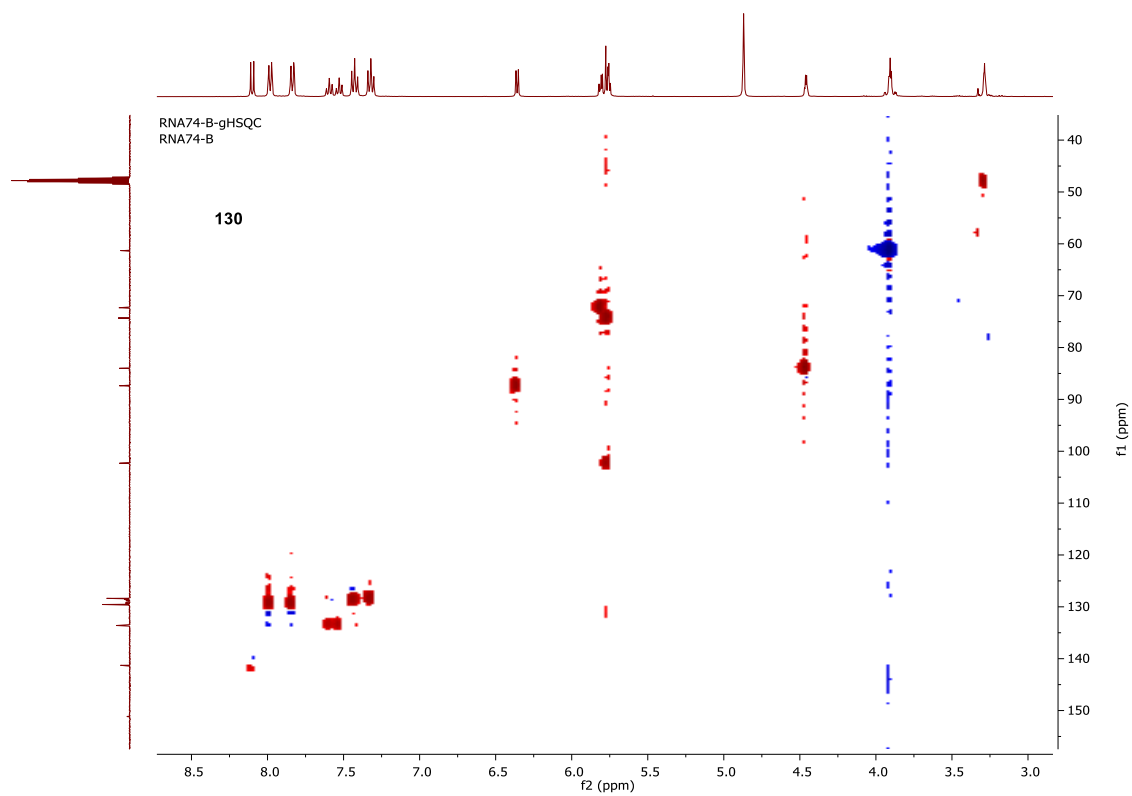
RNA74-B-1H
RNA74-B

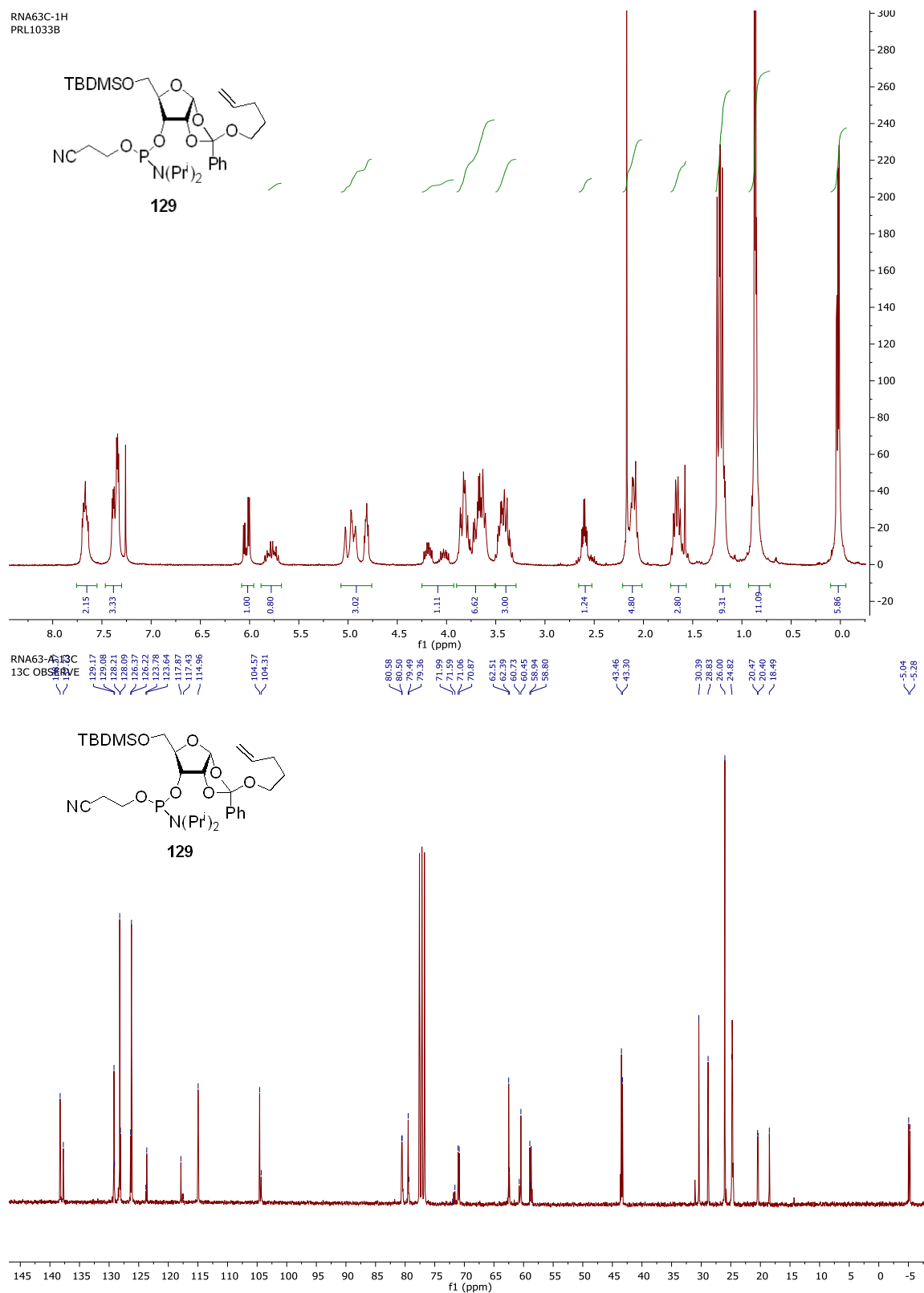
130

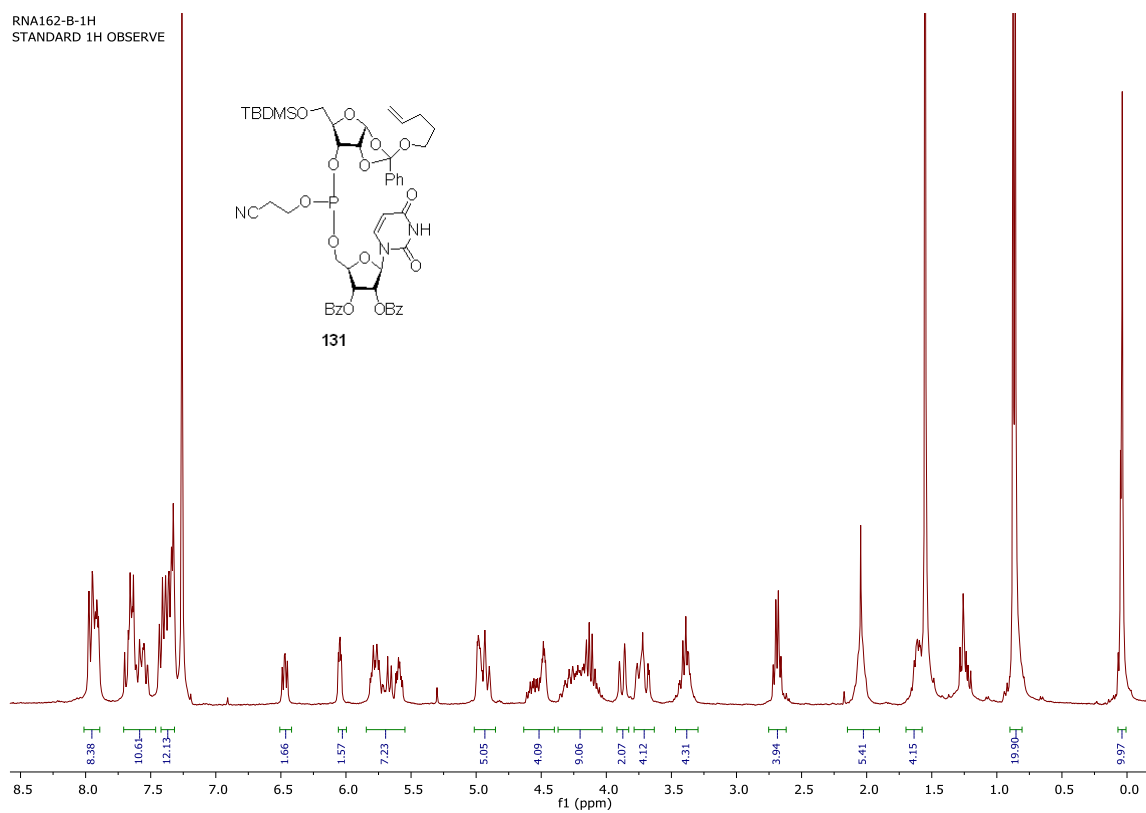
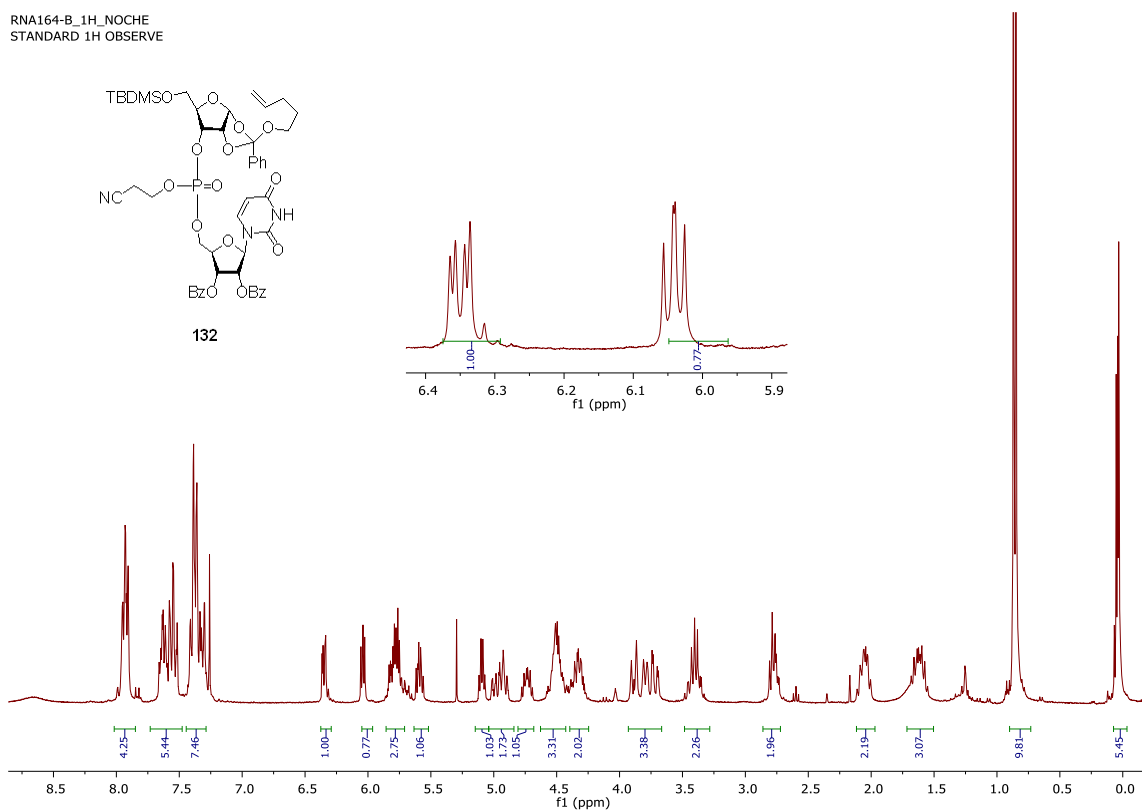
RNA74-B-13C
RNA74-B

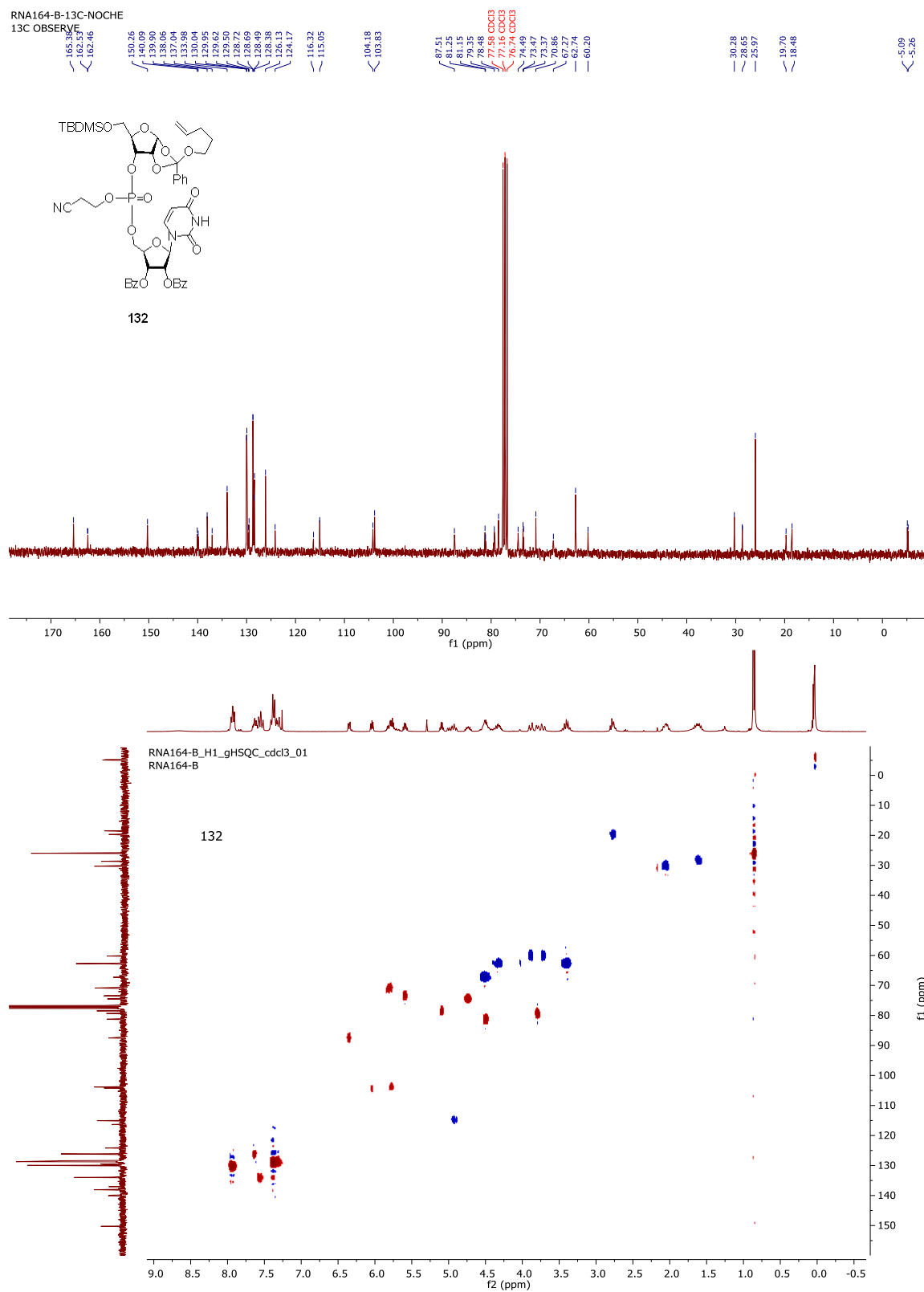
130



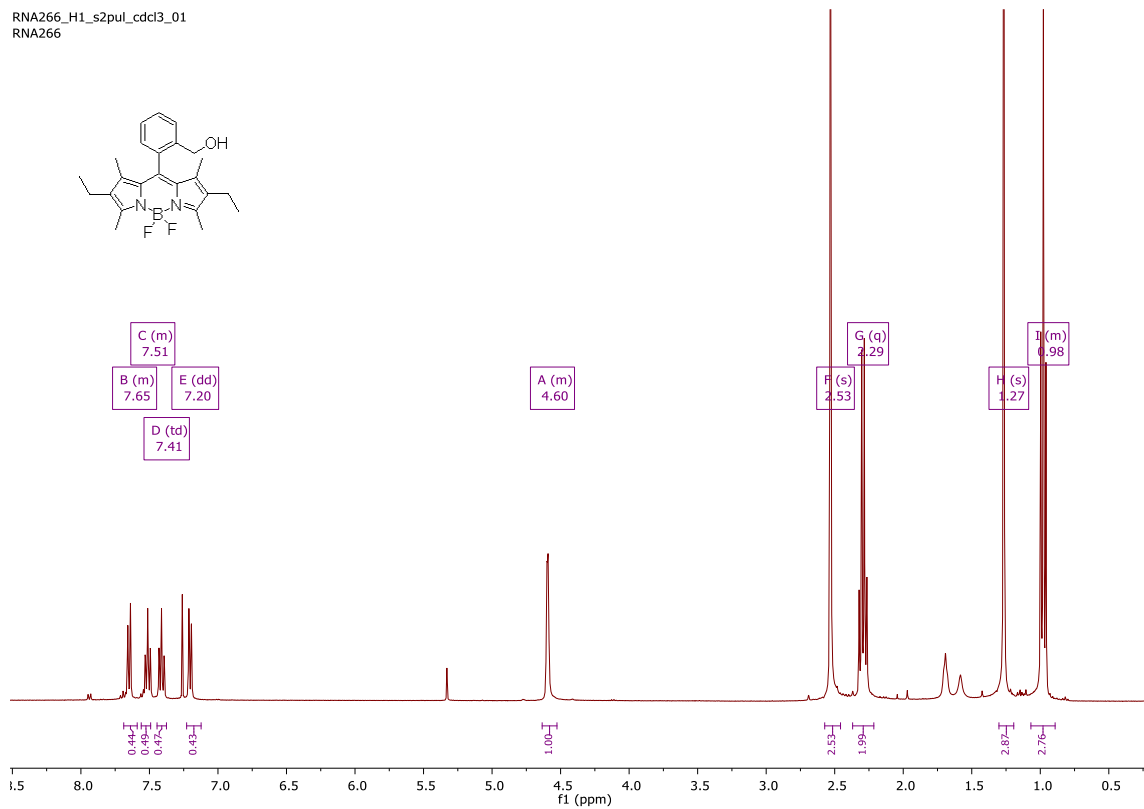




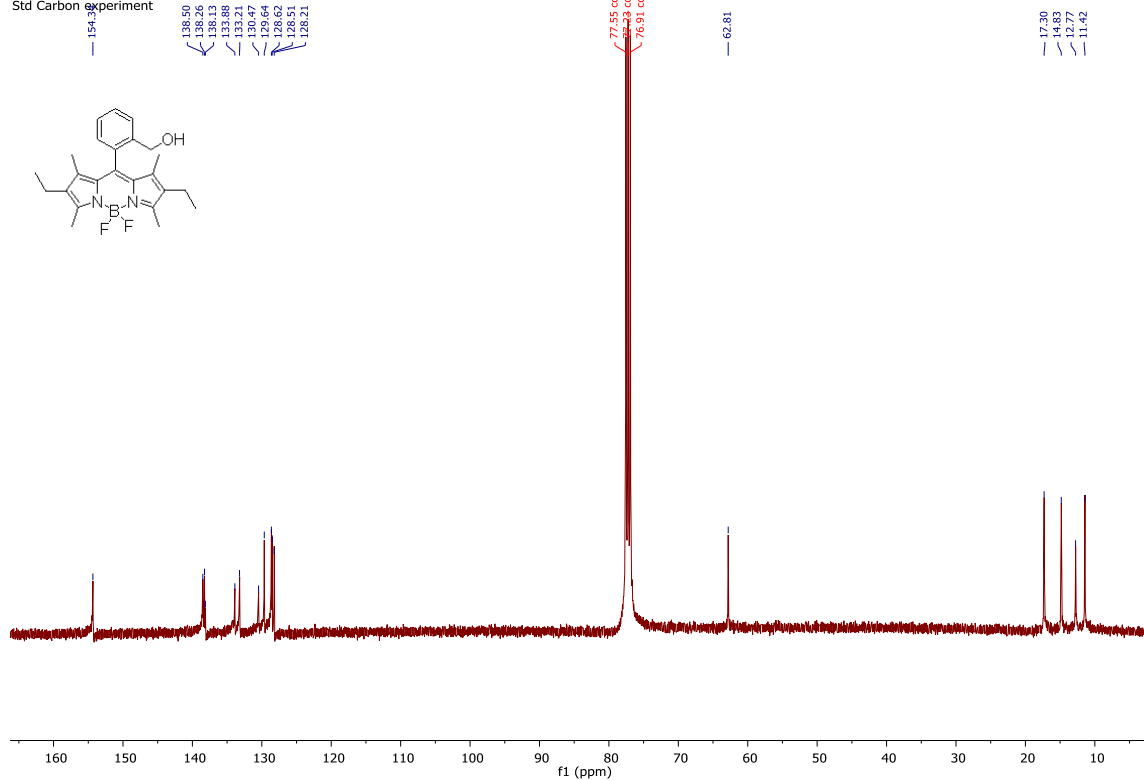
RNA162-B-1H
STANDARD 1H OBSERVERNA164-B-1H_NOCHE
STANDARD 1H OBSERVE

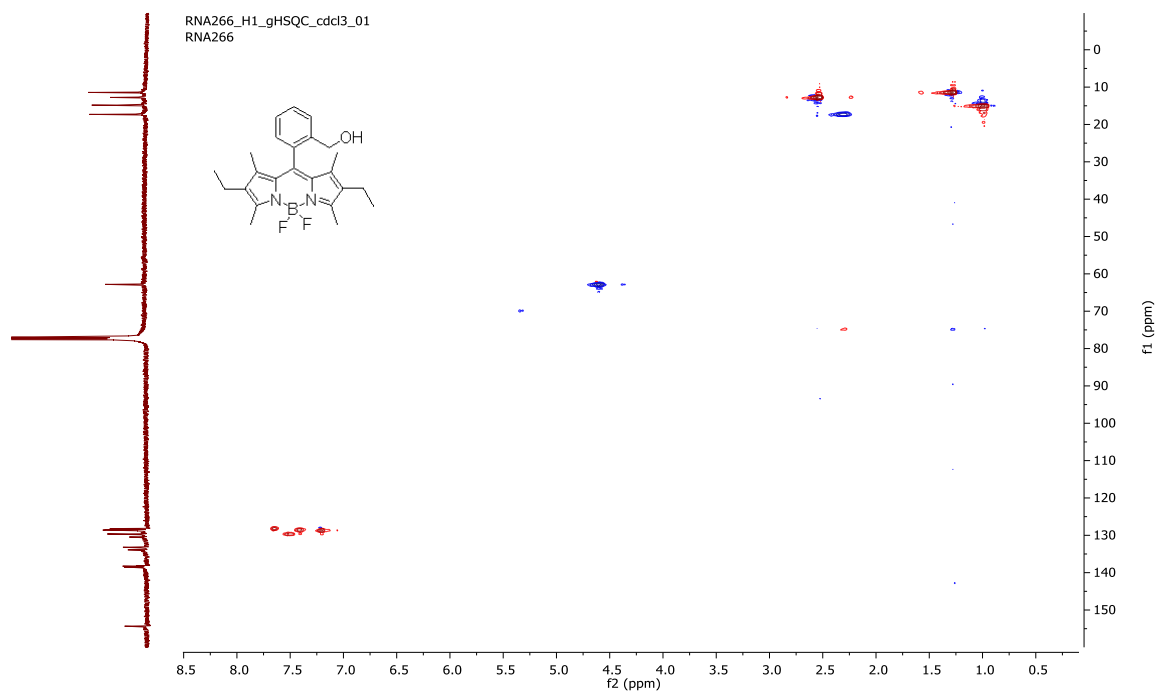
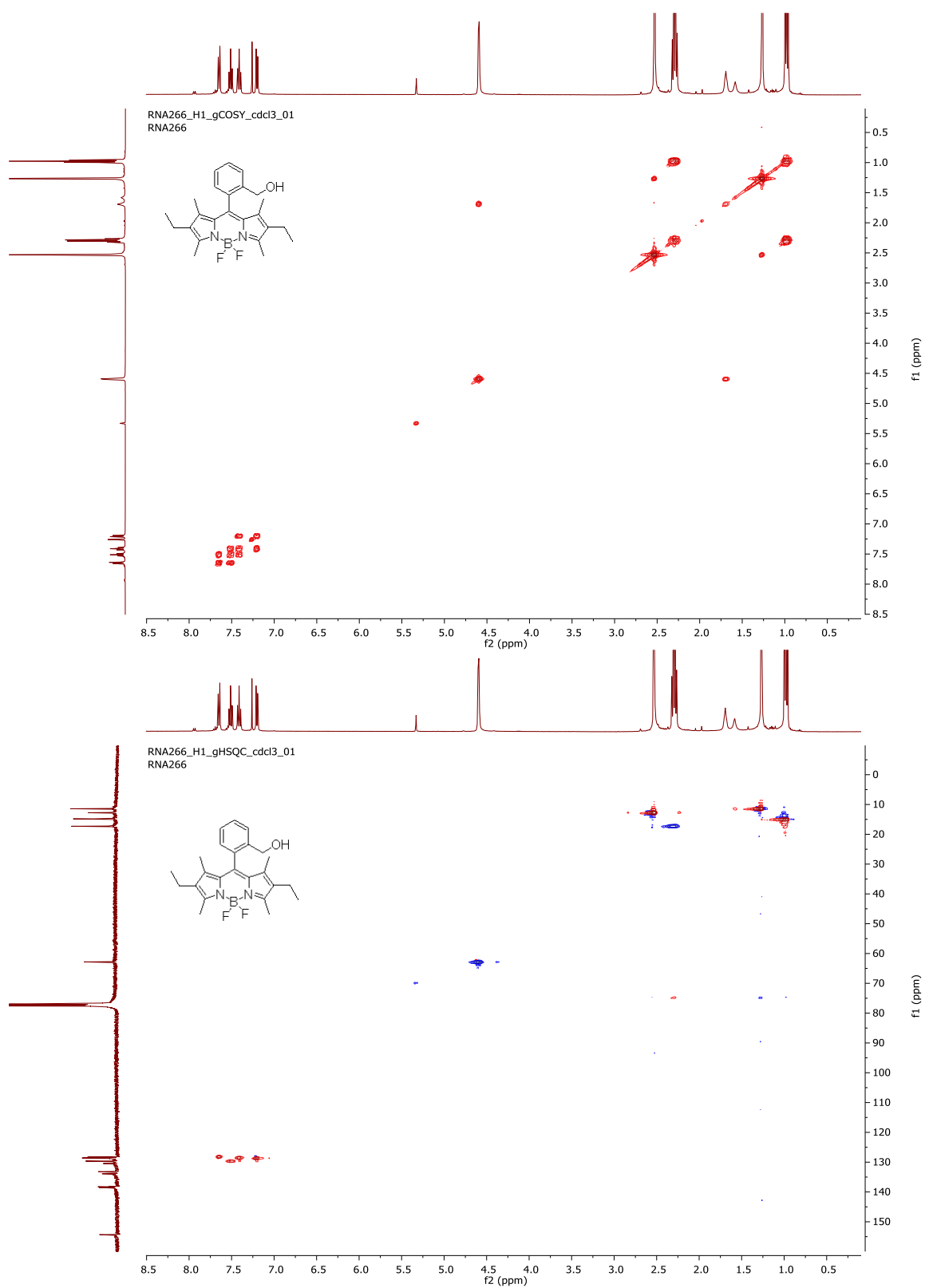


RNA266_H1_s2pul_cdc13_01
RNA266

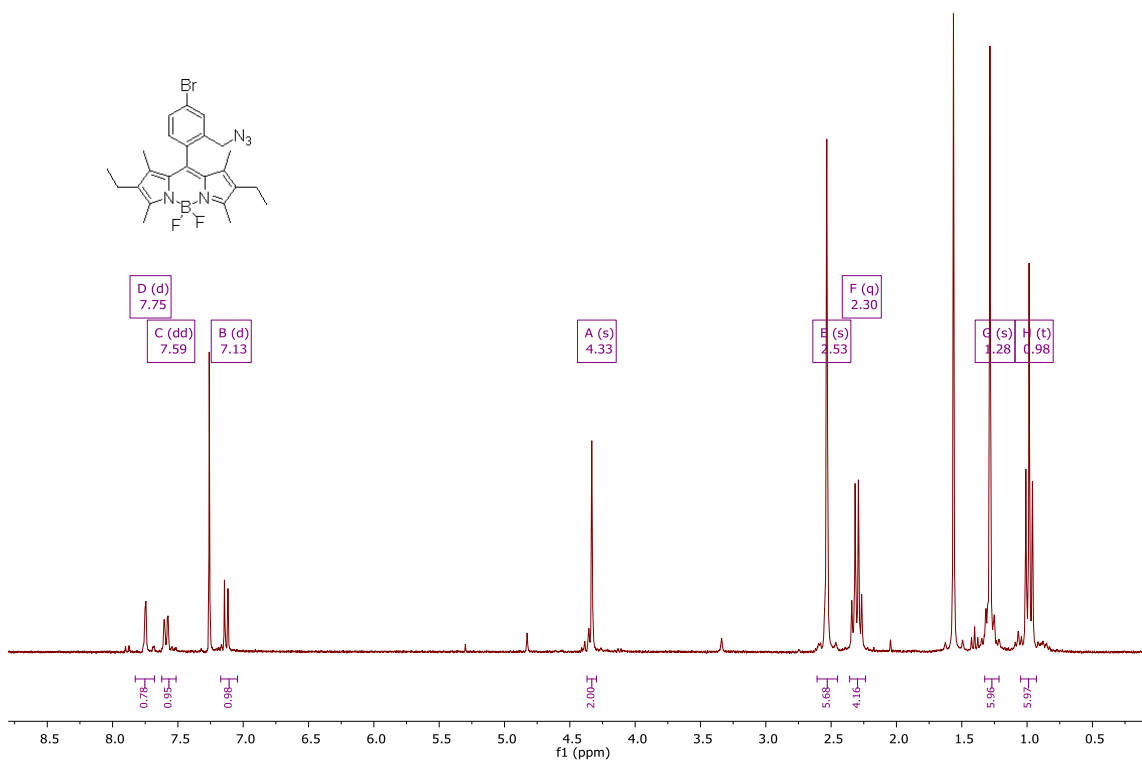


RNA266_C13_s2pul_cdc13_01
Std Carbon experiment

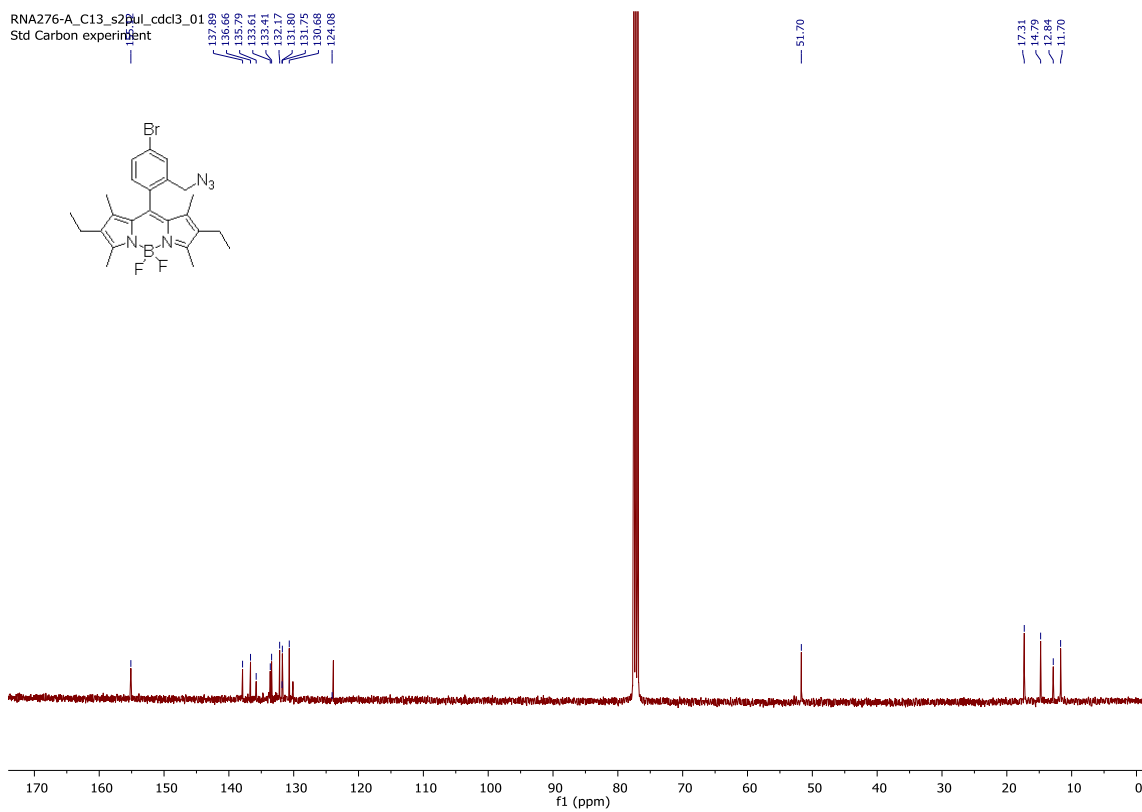


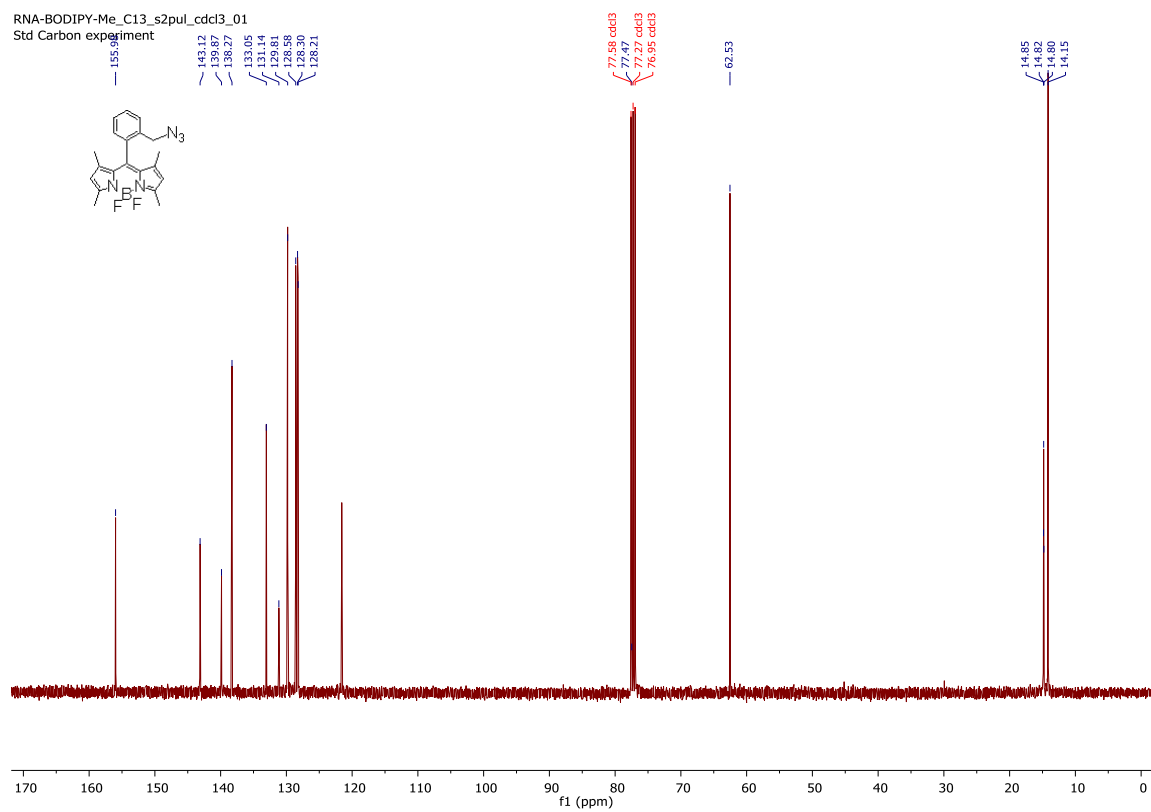
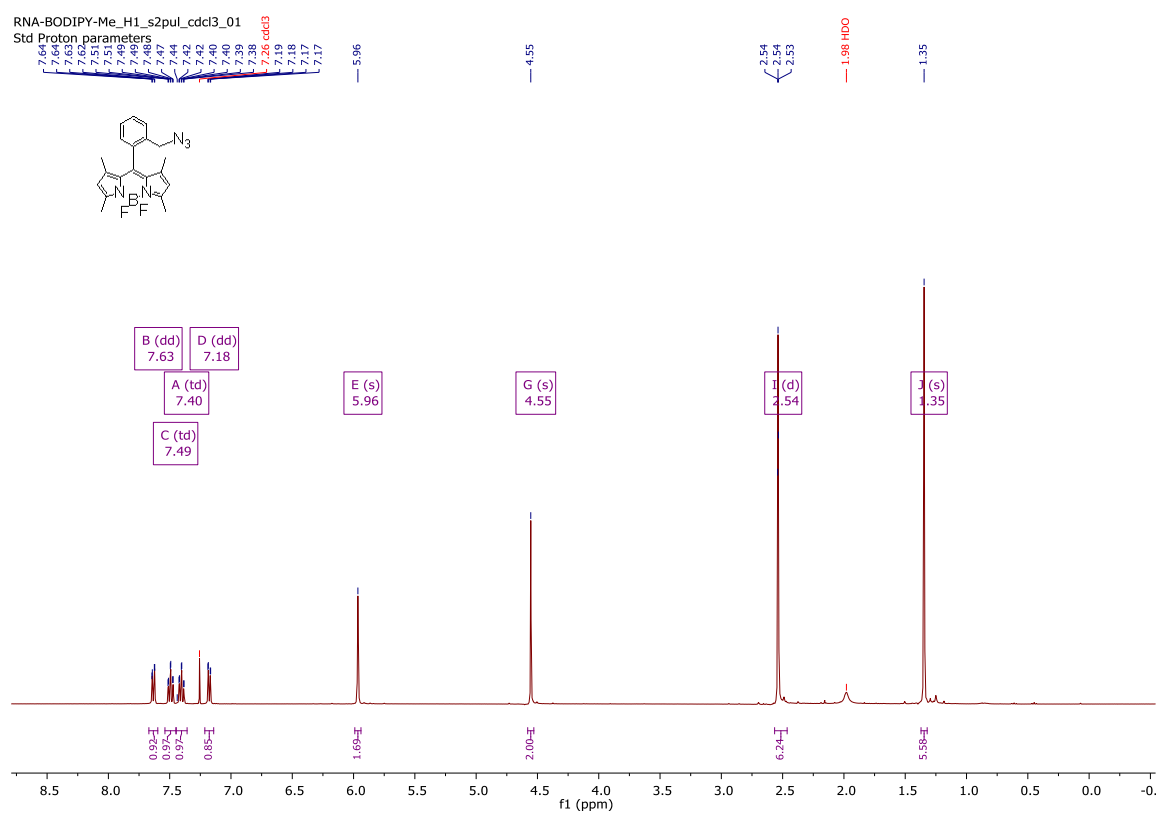


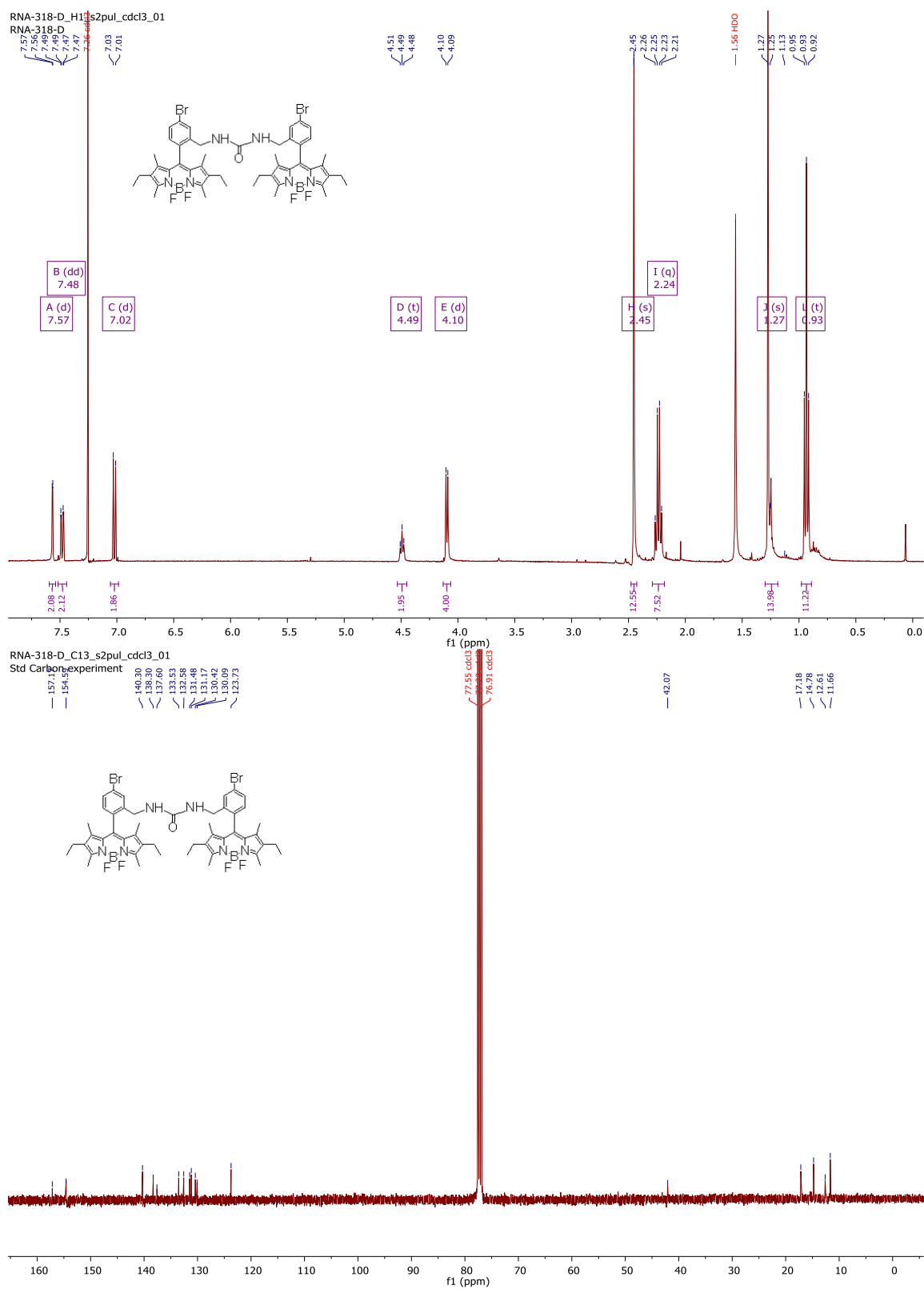
rna276-a
STANDARD 1H OBSERVE



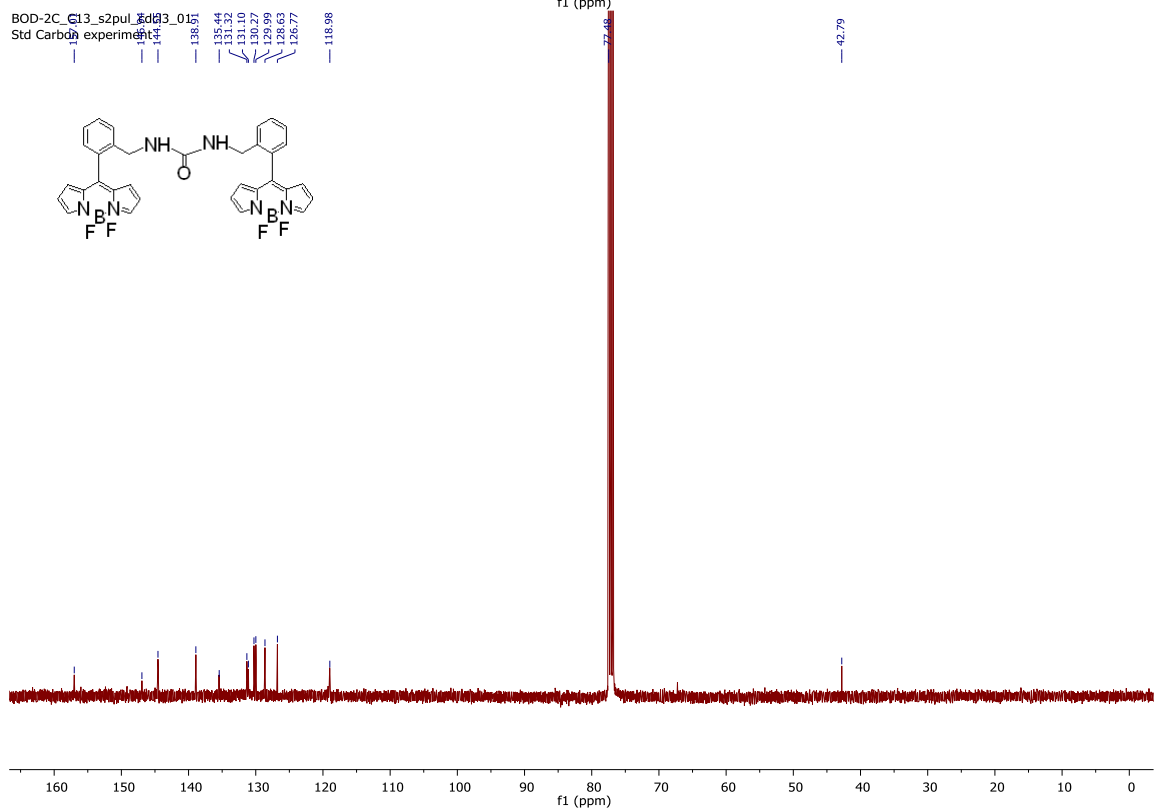
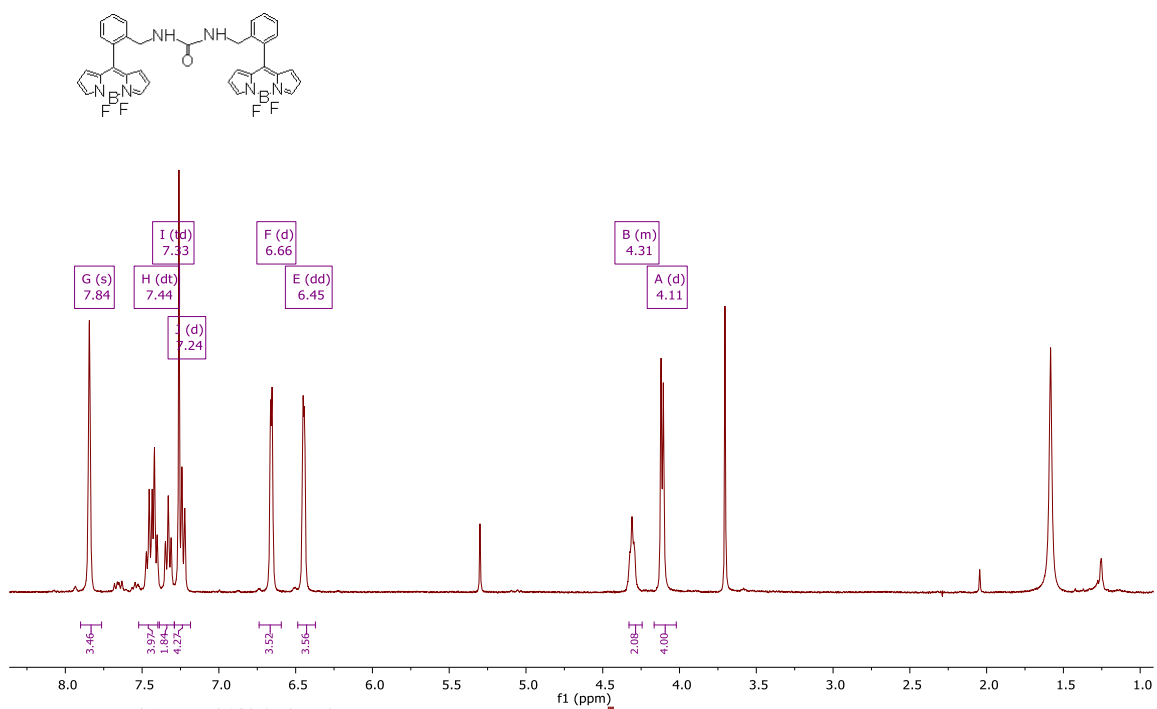
RNA276-A_C13_s2pul_cdc13_018
Std Carbon experiment

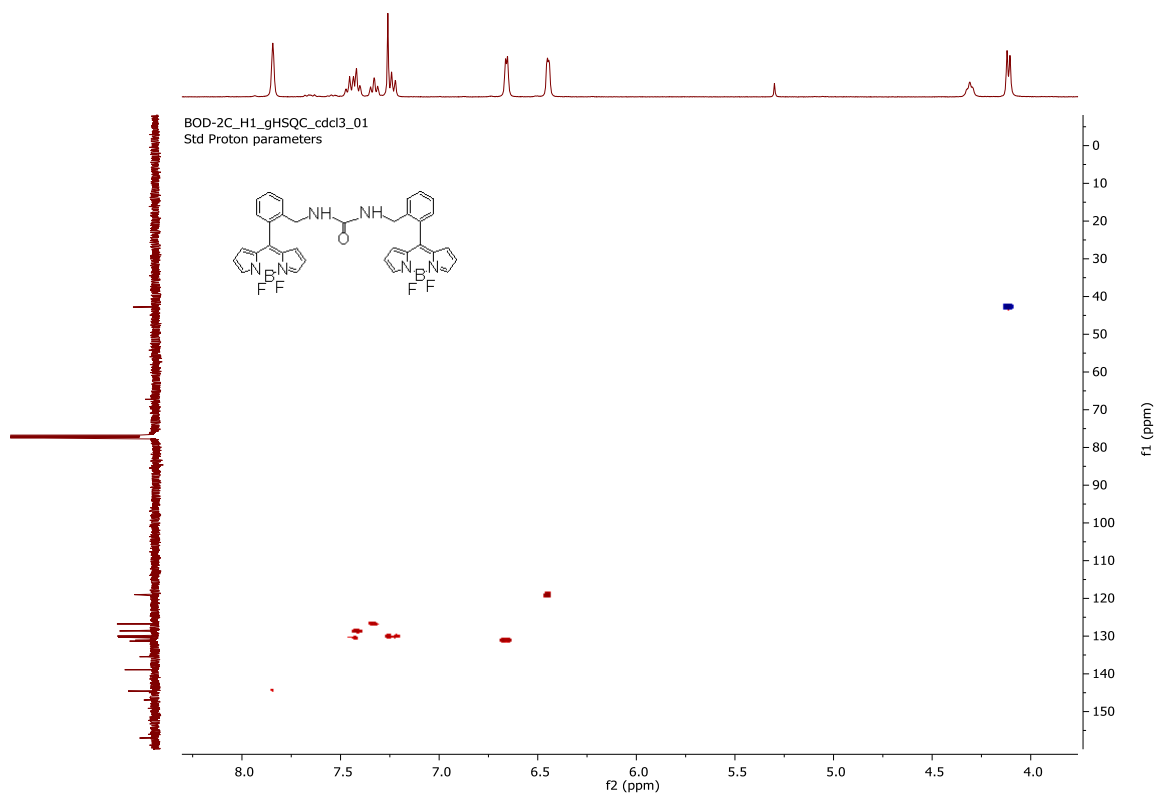




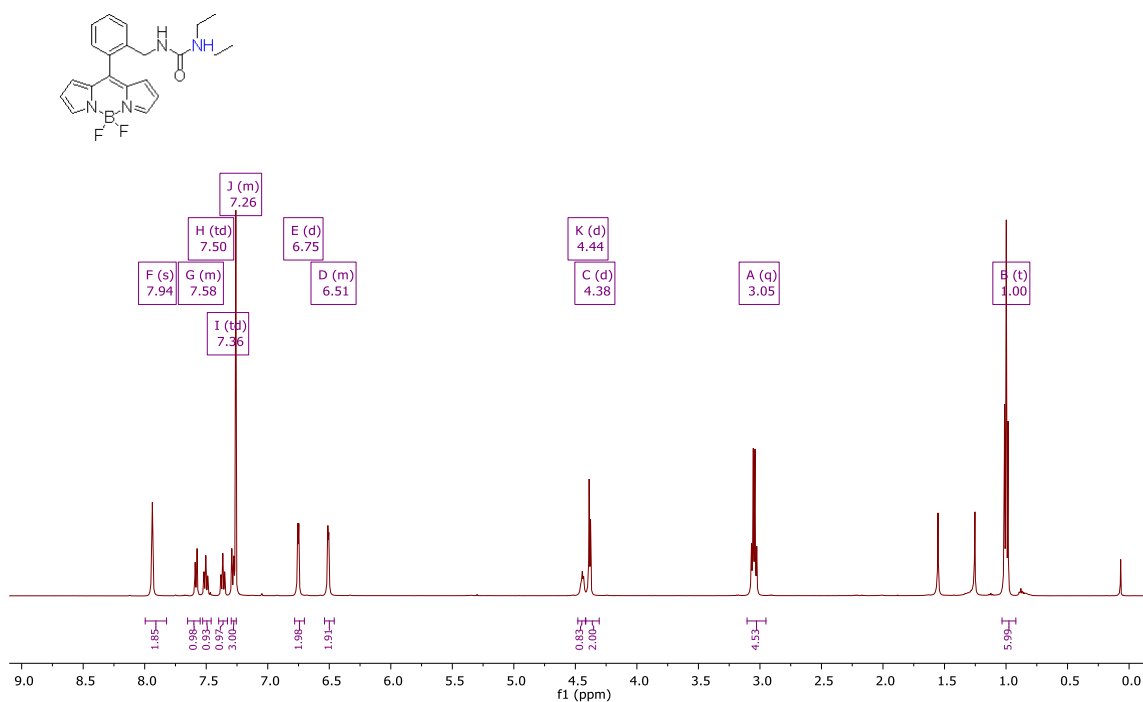


BOD-2C_H1_s2pul_cdc13_01
Std Proton parameters

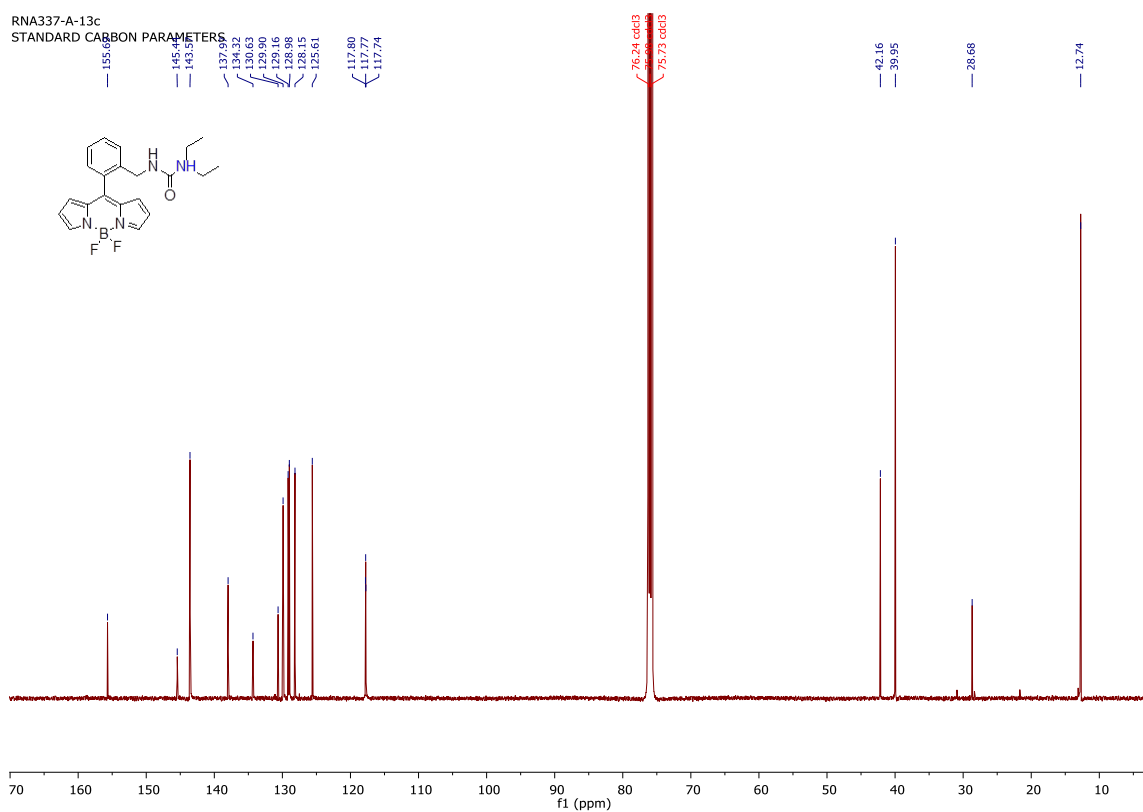




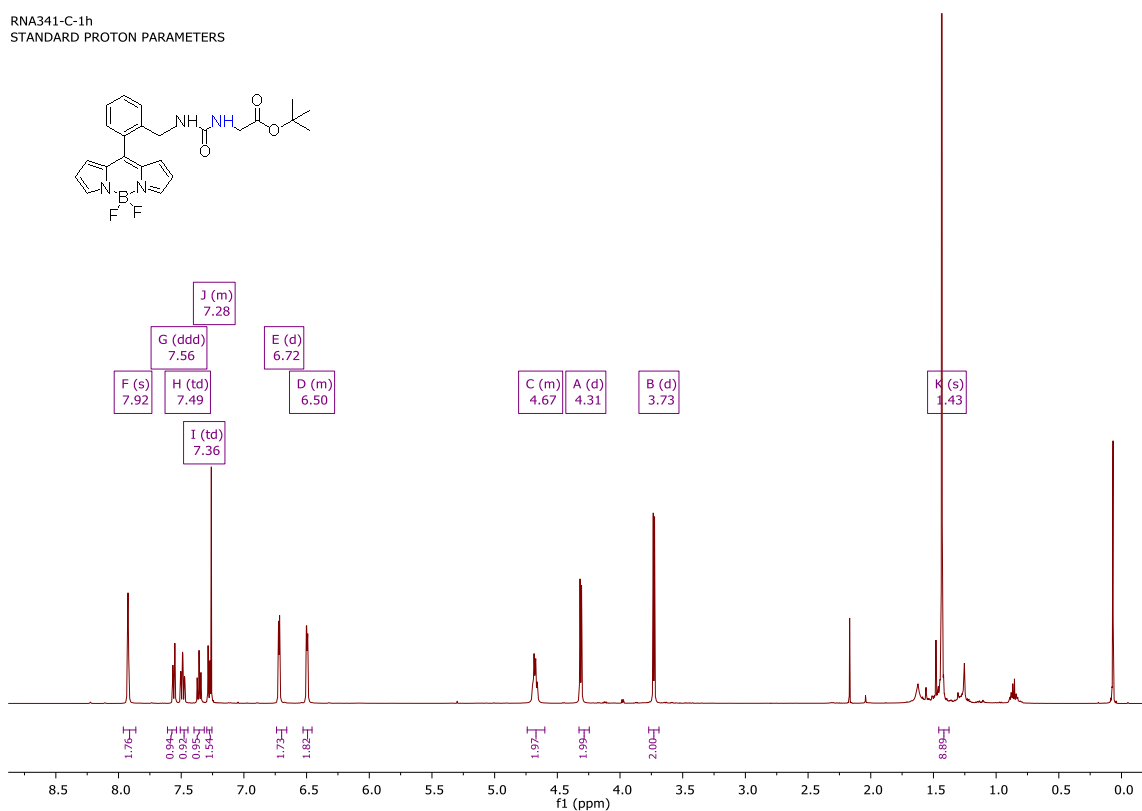
RNA337-A-1h
STANDARD PROTON PARAMETERS



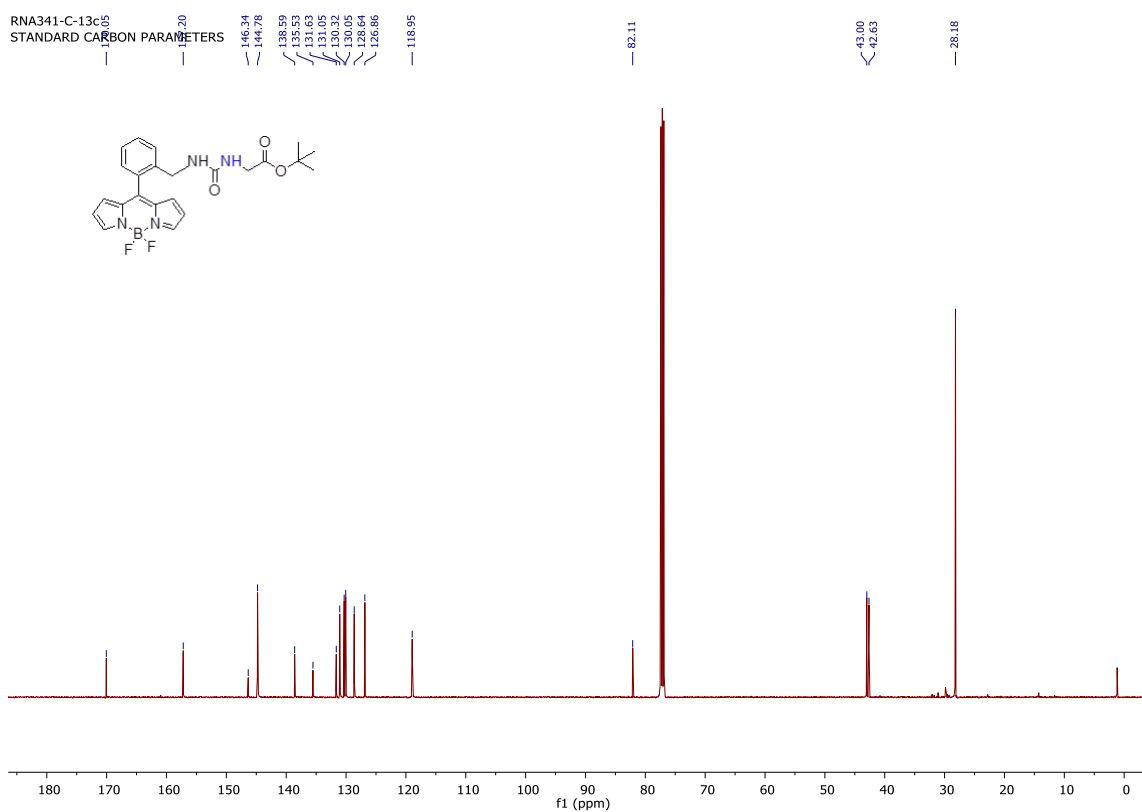
RNA337-A-13c
STANDARD CARBON PARAMETERS



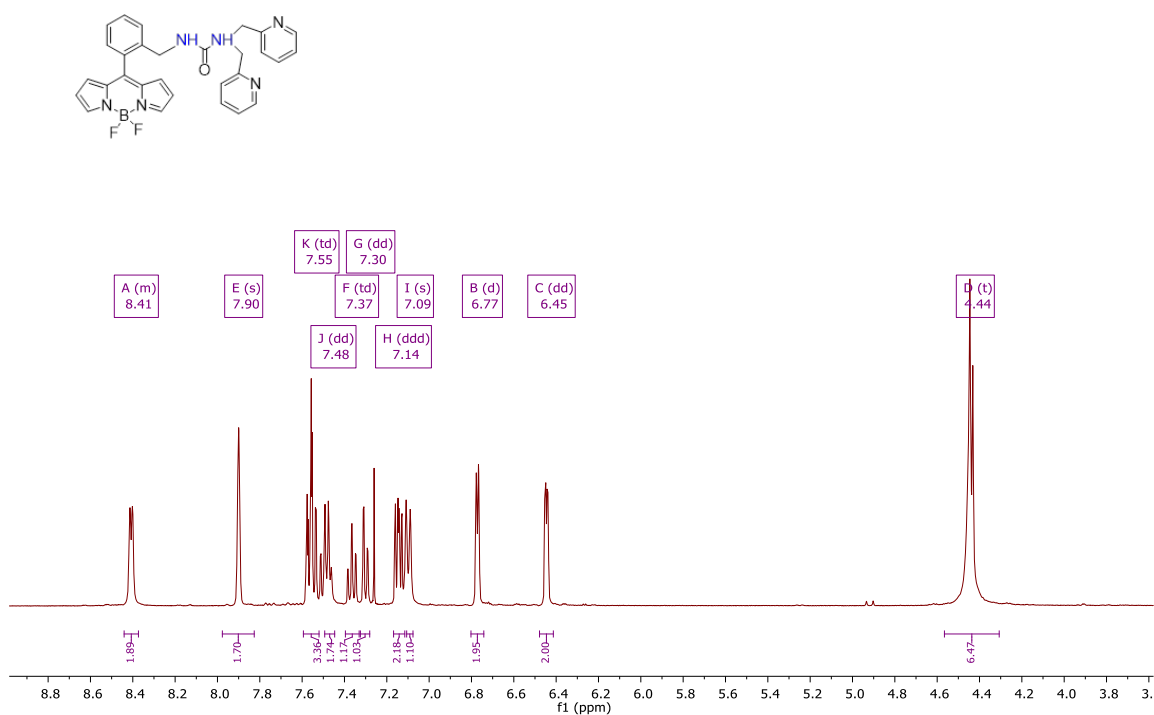
RNA341-C-1h
STANDARD PROTON PARAMETERS



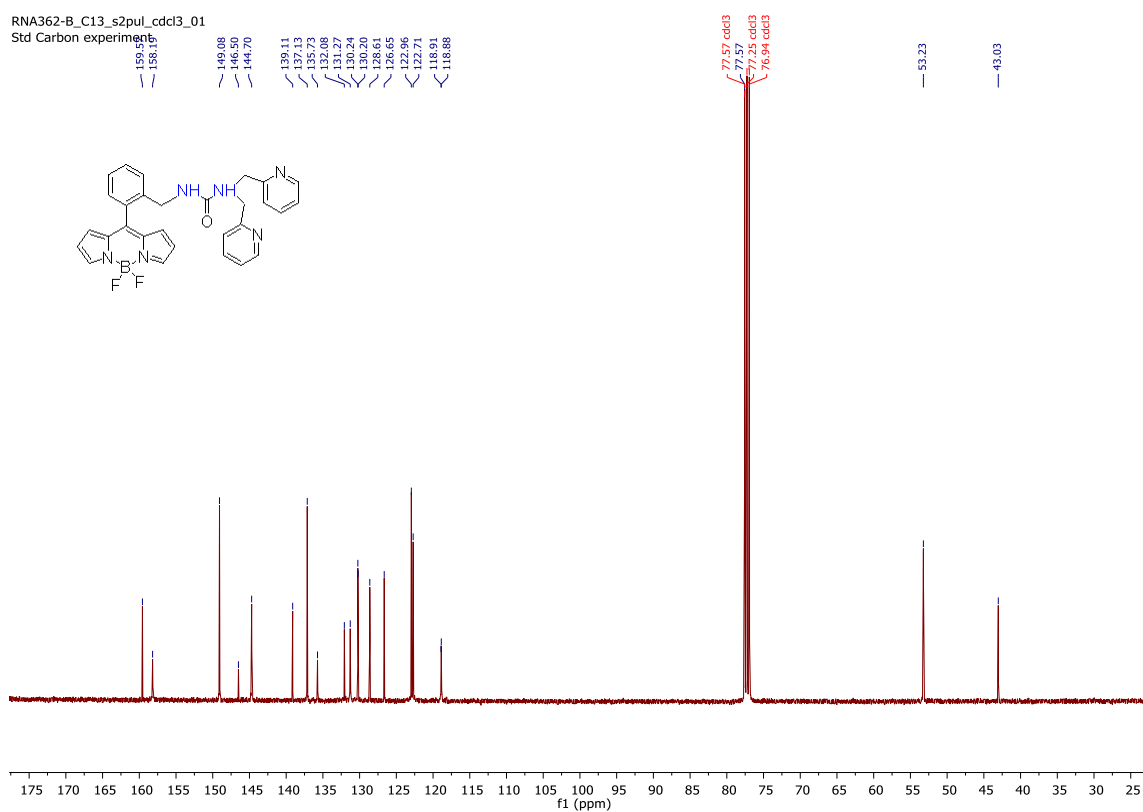
RNA341-C-13c05
STANDARD CARBON PARAMETERS



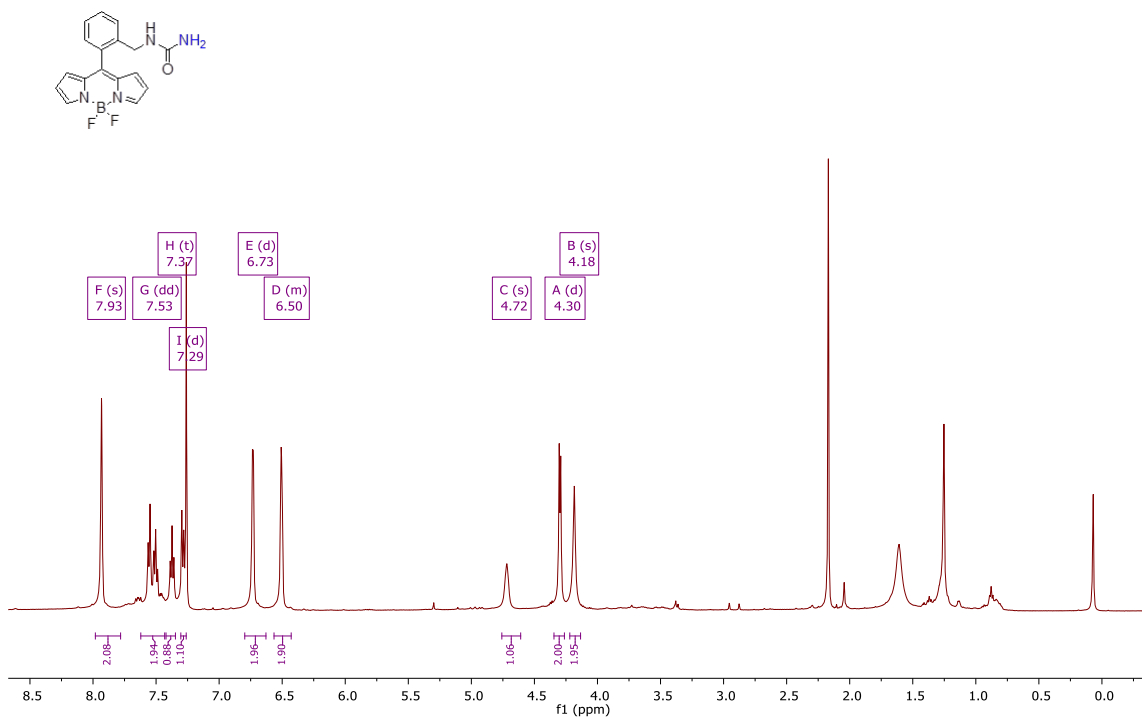
RNA362-B_H1_s2pul_cdc13_01
Std Proton parameters



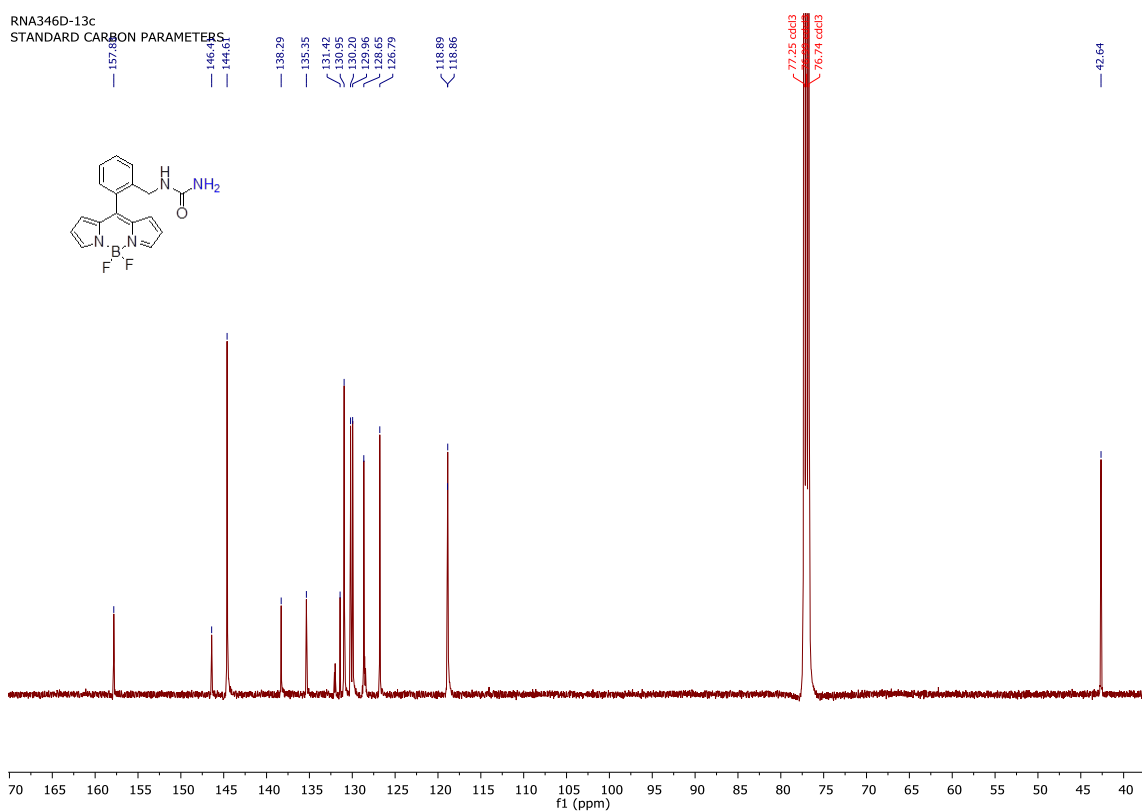
RNA362-B_C13_s2pul_cdc13_01
Std Carbon experiment



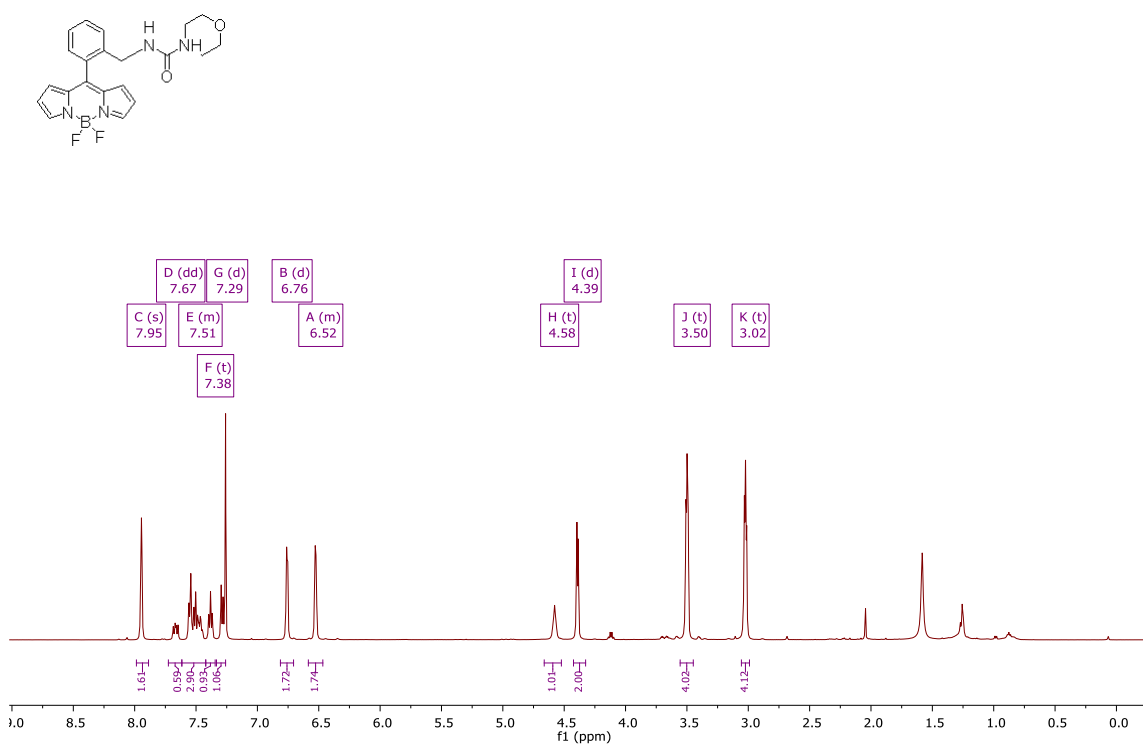
RNA346D-1h
STANDARD PROTON PARAMETERS



RNA346D-13c
STANDARD CARBON PARAMETERS



RNA360-1h
STANDARD PROTON PARAMETERS



RNA360-13c
STANDARD CARBON PARAMETERS

